

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

Micheline LEDER

Pharmacien

Ex-Assistante de Chimie Biologique

Lauréate de la Faculté

Diplômée de Microbiologie et de Sérologie (Université)

Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie appliquée

Diplômée d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique

Diplômée d'Optique scientifique et appliquée

née à NANCY, le 18 décembre 1929

Répartition érythroplasmatique et fixation tissulaire de quelques médicaments

(Etude particulière des Sulfamides et de la Chlorpromazine)

Soutenue le 20 décembre 1955, devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT . . . M. le Doyen KAYSER

JUGES. { M. BLOCH, *Professeur*
 { M^{lle} BESSON, *Maître de Conférences*

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

Micheline LEDER

Pharmacien

Ex-Assistante de Chimie Biologique

Lauréate de la Faculté

Diplômée de Microbiologie et de Sérologie (Université)

Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie appliquée

Diplômée d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique

Diplômée d'Optique scientifique et appliquée

née à NANCY, le 18 décembre 1929



Répartition érythroplasmatisque et fixation tissulaire de quelques médicaments

(Etude particulière des Sulfamides et de la Chlorpromazine)

Soutenue le 20 décembre 1955, devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT . . . M. le Doyen KAYSER

JUGES. { M. BLOCH, *Professeur*
 { M^{lle} BESSON, *Maître de Conférences*

FACULTE DE PHARMACIE
DE NANCY

- ADMINISTRATION -

Doyen : F. KAYSER
Assesseur : A. MEUNIER
Secrétaire : P. RADUREAU

PERSONNEL ENSEIGNANT
PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie Galénique
M ^{le} FRANCOIS M.Th.	Matière Médicale
MM. KAYSER F.	Chimie
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J.G.	Microbiologie
STEINMETZ E.	Sciences Naturelles
BLOCH J.M.	Toxicologie
SOLEIL J.	Pharmacie Chimique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M ^{le} BESSON S.	Pharmacodynamie
N...	Sciences Physiques

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M. MEUNIER A.	Hydrologie
M ^{le} FRANCOIS M.Th.	Hygiène
MM. FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J.G.	Parasitologie
STEINMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
BLOCH J.M.	Chimie Minérale
SOLEIL J.	Chimie organique
ROBLLOT R.	Déontologie
(Professeur à la Faculté de Droit)	
BERNANOSE A.	Physique
MIRJOLET M.	Chimie analytique

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANZIANI P.	Chimie
Mme LASSEUR A.	Microbiologie - Parasitologie
MM. BERNANOSE A.	Physique
MIRJOLET M.	Sciences Pharmaceutiques
BENE R.	Chargé des travaux pratiques de Microbiologie technique
PIERFITTE M.	Chargé des travaux pratiques de Chimie biologique
VILLOUTREIX J.	Chargé des fonctions de chef de travaux pratiques de Micrographie
N...	Chargé des travaux pratiques de Physique.

Doyen honoraire : M. RICHARD G.- Recteur de l'Académie de Besançon
Professeur honoraire : M. CORDEBARD H.
Maître de conférences honoraire : D^r VERNIER P.

A MON PERE ET A MA MERE

bien faible témoignage de ma profonde
reconnaissance filiale.

A TOUS LES MIENS

en gage d'affection.

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE DOYEN KAYSER
Professeur de Chimie

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR BLOCH
Professeur de Toxicologie

MADemoiselle BESSON

Maitre de Conférences
de Pharmacodynamie.

En témoignage de notre grande
reconnaissance.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE
DE PHARMACIE DE NANCY

A NOTRE MAITRE DE STAGE

l'assurance de toute notre
gratitude.

- TABLE DES MATIERES -

=====

Pages:

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION

Le transport des substances organiques et minérales par les molécules protéiques du plasma	1 2
---	--------

Le transport des substances organiques et minérales par les Globules Rouges	10
--	----

PREMIERE PARTIE: Etude des Sulfamides

GENERALITES SUR LA LIAISON PROTEIQUE ET SUR LA REPAR- TITION ERYTHROPLASMIQUE DES SULFAMIDES	15
---	----

EXPERIMENTATION PERSONNELLE SUR LES SULFAMIDES	22
--	----

I - Généralités

Sulfamides utilisés	24
Sang utilisé	25
Technique de dosage	26
Etude de la réaction colorée	29

II - Influence de divers facteurs susceptibles de modifier la répartition érythroplasmique

le pH	30
l'agitation	31
la durée de contact	32
le sang utilisé	34
l'hématocrite	35-36
la substitution du plasma	37
la concentration du sulfamide	41

III - Etude critique de la répartition érythroplasmique du Sulfafurazol utilisé sous sa forme médicamenteuse, la Gantrisine

Généralités	44-45
Influence de l'hydrolyse	46
Influence de l'hématocrite et de la concentration en sulfamide	47
Influence des conditions de la défécation	51
Etude in vivo-Analyse de sangs de malades	54
Solubilités comparées du Sulfathiazol et du Sulfafurazol	56

Répartition comparée dans les tissus - Etude in vitro	57
Essais de dialyse - Etude d'une liaison éventuelle sulfafurazol-protéines	58
<u>DEUXIEME PARTIE : I) Etude de la Chlorpromazine</u>	61
EXPERIMENTATION PERSONNELLE	63
I- Généralités:	
Définition. Formule. Utilisations thérapeutiques	64
Circulation dans l'organisme. Réactions de carac- térisation	65
II- Technique du dosage:	
La réaction colorée: son étude - ses variations	66
Son application au dosage en milieu biologique	69
III- Répartition de la Chlorpromazine dans le sang - Etude in vitro	71
Protocole d'analyse	72
Résultats	73
IV- Répartition de la Chlorpromazine dans les tissus - Etude in vitro	76
Protocole d'analyse	76
Résultats	78
V- Répartition de la Chlorpromazine - Etude in vivo	80
Expériences	82
Résultats	82
VI- La Chlorpromazine est-elle liée aux protéines plasmatiques ?	86
Essais de dialyse	86
Etude d'une liaison éventuelle Chlorpromazine-protéines	89
2) <u>Etude de la Diéthazine et de la Mépyramine</u>	90
I- Généralités	91
II- Technique du dosage	94

III- Répartition tissulaire	94
Etude in vitro	94
Etude in vivo	96

TROISIEME PARTIE : I) Etude de la Strychnine 97

I- Généralités	I00
II- Réactions communes à la strychnine et aux dérivés de la phénothiazine	I01
III- Technique du dosage	I03
IV- Expériences	I03
Sur les tissus	I03
Sur le sang	I05

2) Etude du Salicylate de sodium I06

I- Généralités	I07
II- Expériences in vitro	I09

CONCLUSION II0

BIBLIOGRAPHIE II2

- AVANT - PROPOS -
=====

Ayant eu le privilège de pouvoir, dès ma deuxième année de Faculté, m'initier à la Chimie Biologique, en entrant au Laboratoire de Mlle BESSON, j'ai pu apprécier, au cours de mes années scolaires et post-scolaires, tout l'intérêt que présentaient les recherches biochimiques.

C'est ainsi que, tout naturellement, après avoir terminé mes études, je désirais, en m'inscrivant au Certificat d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique, dont l'enseignement est assuré par M. le Doyen KAYSER, compléter et approfondir mes connaissances en cette matière.

Et sur l'initiative de Mlle BESSON, j'entrepris alors une thèse portant sur l'étude chimique et pharmacologique de quelques médicaments, choisis soit en raison de leur emploi courant, soit en raison de leur introduction récente en thérapeutique.

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur le Doyen KAYSER des encouragements qu'il m'a toujours prodigués et de l'accueil cordial qu'il me réserva en toutes circonstances. Je l'assure de ma sincère et respectueuse reconnaissance.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. le Professeur BLOCH qui, durant toutes mes études, n'a cessé de me porter un intérêt vigilant.

Je n'oublie pas l'aide précieuse qu'il m'apporta, tant par ses conseils que par la documentation qu'il mit toujours spontanément à ma disposition.

Aussi suis-je heureuse de voir aujourd'hui Monsieur le Professeur BLOCH figurer dans la Commission d'Examen chargée de juger mon travail.

Mlle BESSON voulut bien me charger des fonctions de préparatrice, puis d'Assistante aux Travaux Pratiques de Chimie Biologique. Elle fut pour moi, à tous les instants de ma vie d'Etudiante, un guide bienveillant, dévoué et attentif. Se dépensant sans compter, elle me montra, par son seul exemple, la route à suivre.

J'espère ne pas l'avoir trop déçu et je puis l'assurer que je conserverai d'elle et de l'ambiance rayonnante de son Laboratoire, un souvenir ineffaçable.

Sur le point de quitter la Faculté, je tiens à réunir dans une même pensée tous mes camarades des Laboratoires de Chimie Biologique dont j'ai pu apprécier la solidarité et l'amitié.

Ils ont su entretenir autour de moi un climat favorable et agréable; qu'ils en soient ici remerciés.

Je n'oublie pas, enfin, que mes recherches ont pu être poursuivies grâce à la complaisance du Centre de Transfusion Sanguine de Nancy et de son Directeur, M. le Professeur MICHON.

Et je ne veux pas manquer non plus de mentionner l'aide considérable et spontanée que m'ont apportée les Etablissements SPECIA (en la personne de MM. BARRAL et LEBAS), ainsi que les Etablissements ROCHE, en me procurant gracieusement tous les échantillons nécessaires à mes travaux.

Je leur adresse mes plus sincères remerciements.

c
o o

- INTRODUCTION -
=====

Le sang apporte aux tissus les éléments nutritifs dont ils ont besoin. D'une façon schématique, et assez superficielle, on dit que le plasma tient en dissolution ces éléments et l'oxygène qui lui est transmis par les globules rouges.

Aussi simple et aussi satisfaisante que paraisse une telle constatation, elle n'en comporte pas moins une approximation. Et cette approximation risque de laisser dans l'ombre la complexité du transport des substances médicamenteuses par le sang.

Le plasma n'est pas un véhicule inactif et les globules rouges ne limitent pas leur rôle à un transport d'oxygène. Il s'agit d'un ensemble dynamique dont nous allons voir toute la richesse.

Trois notions fondamentales nous serviront de fil directeur dans cette étude:

1°) la matière protéique est particulièrement plastique. En raison de la grosseur de ses molécules et de sa nature micellaire, elle possède des propriétés adsorbantes très étendues.

2°) Les globules rouges "tissu circulant" manifestent aussi des propriétés adsorbantes.

3°) Des substances physiologiques et des molécules médicamenteuses sont susceptibles de se fixer sur les protéines ou sur les globules rouges.

Ces trois notions nous conduisent à envisager les molécules protéiques du plasma et les hématies comme susceptibles de transporter elles-mêmes des substances actives.

Sous ce jour, le transport des substances nutritives et des médicaments par le sang se présente sous un double aspect que nous verrons successivement:

- Le transport par les molécules protéiques du plasma,
- Le transport par les globules rouges.

I - LE TRANSPORT DES SUBSTANCES ORGANIQUES ET MINERALES PAR LES MOLECULES PROTEIQUES.

=====

La liaison des protéines à d'autres constituants du plasma est trop connue pour que nous y insistions. Cependant, il convient de la mentionner avant d'étudier la liaison entre protéines et médicaments.

C'est à MACHEBOEUF que nous devons de connaître les combinaisons de protides avec les lipides, le cholestérol, les phosphatides, combinaisons qu'il désigna sous le nom de cénapses (cénapses lipidoprotidiques, etc...). Grâce à cette combinaison, les lipides insolubles sont solubilisés et en même temps dissimulés à leurs solvants habituels. Il s'agit donc là d'une liaison assez forte.

Peu à peu, d'autres combinaisons protidiques furent identifiées: avec le calcium, avec des hormones (stéroliques en particulier), avec des glucides... (pour ne parler que d'éléments existant normalement dans le sang). Les diverses combinaisons médicamenteuses ont fait l'objet d'un important travail d'ensemble de GOLDSTEIN, dont nous nous sommes inspirée (61) et d'autres travaux (6) (31) (32) (95).

I) Comment peut-on démontrer qu'une substance est liée à une protéine?

Il existe de nombreuses techniques, elles sont basées sur l'un des trois principes suivants:

En présence de protéine:

A- La substance semble avoir diminué en quantité, son activité biologique peut être également affaiblie.

B- Certaines propriétés de la substance sont modifiées.

C- Les protéines peuvent, elles aussi, présenter un changement de propriétés.

Nous allons passer rapidement en revue ces différentes techniques.

A- Méthodes basées sur une réduction de la concentration de substance active:

a) par mesure d'une réaction biologique:

Nous citerons un exemple: la liaison du calcium avec les protéines. Elle a été mesurée par Mc LEAN et HASTINGS (82) en utilisant la réduction de l'activité du calcium en présence de sérum sur le coeur de grenouille. Il faut évidemment qu'une fraction notable de la substance soit liée pour que l'effet pharmacodynamique s'en ressente. Le calcium

se prête fort bien à une telle détermination.

b) par dialyse:

Les protéines du sérum sont retenues à l'intérieur d'une membrane semi-perméable; les molécules libres traversent cette membrane. A l'équilibre, la substance libre se trouve également répartie des deux côtés et un surplus dans l'enceinte des protéines doit représenter la partie liée.

Cette méthode ne renseigne pas exactement sur la quantité de substance susceptible de se lier aux protéines, car les conditions opératoires interviennent beaucoup. Elle démontre cependant s'il y a ou non liaison protéique.

c) par ultrafiltration:

La solution aqueuse est exprimée à travers une membrane semi-perméable. L'ensemble présente une certaine analogie avec une filtration glomérulaire. Mais le procédé ne vaut pas la dialyse en raison du changement continu de la concentration en protéines. Toutefois, il s'agit là encore, d'une méthode susceptible d'indiquer la présence ou non d'une combinaison protéique.

d) Mentionnons enfin la conductivité, la pression osmotique, la tension superficielle comme méthodes moins utilisées.

B - Méthodes basées sur la modification des propriétés de la substance étudiée.

a) Solubilité:

Un des procédés les plus simples pour démontrer une interaction drogue-protéine est de prouver qu'une substance peu soluble se dissout mieux en présence de protéine.

On sait depuis longtemps que le chloroforme, l'éther sont plus solubles dans le sérum que dans une solution saline, les sels mercuriques se dissolvent beaucoup plus rapidement dans le sérum que dans l'eau. Faut-il rappeler enfin que le cholestérol, les acides gras, les hormones stéroïdes, la vitamine A, toutes substances insolubles dans l'eau, sont solubilisés dans le plasma grâce à leur combinaison protéique.

b) Diffusion:

Ce procédé a été utilisé en particulier par BENNHOLD (6) pour comparer les propriétés diffusantes de plusieurs colorants. La solution est coulée sur de la gélatine; on note à quelle profondeur le colorant a pénétré, d'une part, lorsqu'il est en solution pure, d'autre part, lorsque cette solution a été additionnée de protéine. La méthode a été appliquée à l'étude des médicaments, nous aurons l'occasion d'en parler à propos des sulfamides.

c) Stabilisation:

Si des substances se décomposant en solution aqueuse sont protégées

dire qu'elle implique une adsorption indéfinie si la concentration de la solution augmente; or, la surface adsorbante est limitée. Aussi la formule de LANGMUIR répond-elle mieux à la réalité.

2 - Isotherme d'adsorption de LANGMUIR:

$$y = \frac{x}{m} = \frac{b c}{\frac{1}{a} + c}$$

c, x et m ont la même signification que ci-dessus
a et b sont des constantes.

L'équation exprime qu'à de très hautes valeurs de c, l'adsorbant se sature, le terme entier approchant une valeur limite b. L'isotherme de LANGMUIR est équivalent de la loi d'action de masse qui régit sous une forme courante l'association réversible de deux composants.

Les deux formules précédentes peuvent être vérifiées dans certains cas sans signifier pour autant que les forces en jeu sont de nature physique plutôt que chimique. Le terme "adsorption" n'a qu'une valeur descriptive.

Il y a plusieurs possibilités mathématiques d'utiliser ces formules pour exprimer en graphiques des relations diverses, mais cela n'est possible que dans des conditions bien déterminées d'équilibre et de pureté des protéines.

Nous retiendrons des résultats obtenus par application de ces formules les conclusions suivantes:

La quantité de substance liée dépend de:

- la concentration en protéine
- la concentration en substance
- la constante de dissociation du complexe
- le pouvoir de fixation de la molécule protéique étudiée.

3) Interprétation des résultats de l'expérimentation sur les combinaisons protéiques:

Les résultats obtenus dans les expériences et par application des lois d'adsorption ont permis de connaître et de préciser comment se comportaient vis-à-vis des protéines les constituants normaux du plasma et les médicaments.

Ces résultats permettent de répondre aux questions suivantes:

1°) Y a-t-il des substances qui ne contractent pas de liaison avec les protéines?

Disons tout de suite qu'il faut conclure avec réserves à une absence de liaison d'un médicament. Il s'agit, en effet, bien souvent

d'une adsorption très lâche, l'équilibre avec la drogue non liée se trouvant rompu soit par simple dilution soit par dialyse. Ceci rend donc douteux le résultat de l'expérimentation.

D'autre part, pour déceler une liaison protéique, il convient d'employer des concentrations qui ne soient pas trop élevées; on utilise de préférence, pour que le phénomène soit visible, des taux réalisés en thérapeutique.

Parmi tous les éléments minéraux, le sodium, le magnésium, le chlore, le phosphore seraient peut-être les seuls, suivant certains, à ne pas être liés.

Les substances organiques semblent bien contracter, toutes, des liaisons protéiques.

La très grande majorité des médicaments a été trouvée liée en partie, et encore pour les résultats négatifs, il convient d'être très prudent en raison de l'existence de liaisons plus ou moins solides. DAVIS (d'après 39) pense, en effet, qu'aucun médicament n'est totalement libre.

2°) La liaison protéique est-elle de la même nature pour toutes les substances?

D'une façon générale, la dénaturation des protéines supprime en grande partie leur aptitude réactionnelle, si bien que la plupart des substances liées sont libérées. Citons l'exemple des sulfamides sur lequel nous aurons à revenir longuement: ces médicaments qui se lient aux protéines passent en solution lorsque les protéines sont précipitées à la défécation trichloracétique.

Pour d'autres médicaments, il y a un entraînement partiel dans le précipité protéique.

Enfin, pour certaines substances naturelles et pour des médicaments, la liaison résiste totalement à la dénaturation: on sait que le cholestérol, les lipides, les pigments biliaires sont entraînés dans le précipité de protéines provoqué par certains déféquants. De même, l'arsphénamine, la Suramine se retrouvent quantitativement dans le précipité protéique (41) (107).

Suivant GOLDSTEIN (61), si une protéine entraîne dans sa précipitation une substance, on est sûr qu'elle est liée aussi in vivo, mais dans le cas contraire, on ne peut conclure à l'absence de liaison. Et ceci nous amène à envisager la solidité de la liaison protéique.

3°) Quelle est la solidité de la liaison protéique?

Nous venons de rappeler que la dénaturation des protéines faisait apparaître l'existence de liaisons plus ou moins solides.

Par ailleurs, une différence de solidité peut être prouvée par le fait que des substances peuvent en déplacer d'autres de leurs combinaisons protéiques. C'est ainsi que:

le véronal diminue la liaison du rouge de phénol
l'atropine s'oppose à la liaison de la pilocarpine.

Enfin, la liaison protéique peut céder devant une substance ayant

pour le médicament envisagé une affinité supérieure à celle que manifeste la protéine elle-même. Nous pouvons, à ce sujet, rapporter l'expérience de KIMMIG et WESELMANN (74). Ces auteurs ont montré que certains sulfamides ne peuvent être décelés dans la solution après ultrafiltration d'un sérum sanguin. Il s'agit donc de sulfamides fortement liés aux protéines. Si ce même sérum est additionné de charbon animal et filtré, on retrouve dans le filtrat en presque totalité, les protéines, mais on ne trouve pas de sulfamides. Donc, la liaison avec les protéines démontrée par l'expérience précédente a été rompue; ceci prouve bien que la liaison sulfamide-protéine ne peut être qu'une simple adsorption. Nous reviendrons sur cette expérience dans notre étude de la Chlorpromazine (p. 89).

4°) La liaison protéique est-elle réversible ou irréversible?

Il y a deux tests valables de réversibilité: la rupture de la liaison par simple dilution et la rupture par le charbon qui ne modifie pas l'intégrité de la protéine (C'est l'expérience de KIMMIG et WESELMANN que nous venons de citer).

5°) Les fractions protéiques présentent-elles entre elles des différences dans leur capacité de liaison?

L'albumine semble posséder une beaucoup plus grande affinité d'adsorption que les globulines. Le transport des substances médicamenteuses est pratiquement assuré par l'albumine seule (6) (95)

Au contraire, de nombreuses substances circulant normalement dans le plasma sont liées aux globulines (ex: cénapses lipido-protéiques). Il ne s'agit pas alors, dans ces combinaisons protéiques, d'un simple phénomène d'adsorption.

4) Importance pharmacodynamique de la liaison protéine-médicament:

1°- La labilité de la liaison a une grande importance. Prenons deux exemples de substances naturelles dans le sang: l'urée et le calcium.

Le pourcentage d'urée (37%) liée aux protéines plasmatiques ne semble modifier en rien l'activité de cette substance. Au contraire, on sait que les dosages chimiques du calcium (calcium libre + calcium lié) ne correspondent pas à l'activité biologique de cet élément; sa forme non liée intervenant seule.

2°- La combinaison, du fait qu'elle lie un médicament à une protéine non dialysable, entraîne des effets notables. Ces derniers se manifestent tant au point de vue de l'excrétion des médicaments dans l'organisme que de leur répartition.

a) L'excrétion:

On a montré, en effet, que la filtration glomérulaire correspond à une ultrafiltration in vivo. Elle ne saurait donc laisser passer que la fraction plasmatique de médicament non lié aux protéines.

Il convient donc lorsqu'on établit une clearance, de connaître à quel état, libre ou lié, se trouve dans le plasma la substance considérée. Seule, la fraction non liée doit entrer dans le calcul de cette

clearance.

Qu'une substance en grande partie liée s'excrète à une concentration beaucoup plus élevée que ne le permettrait la filtration de sa seule fraction libre, implique une sécrétion tubulaire se surajoutant à la filtration glomérulaire. Mais il faut admettre alors que la liaison protéique est rompue avec une extraordinaire rapidité.

Nous citerons, comme exemples de telles substances: un colorant le rouge de phénol et un antibiotique, la pénicilline G.

b) La répartition:

- La diffusion dans le liquide céphalo-rachidien.

On a longtemps considéré le L.C.R. comme un ultrafiltrat du plasma. Cette conception n'est pas tout à fait exacte, mais il semble bien qu'à l'état normal, seule la fraction plasmatique non liée d'un médicament soit capable de passer dans le L.C.R. Ceci est vrai en particulier pour les sulfamides; nous aurons l'occasion d'y revenir.

- Le stockage des médicaments:

Etant donnée l'affinité de certaines substances pour les protéines, on conçoit aisément que les protéines tissulaires puissent - à l'image des protéines plasmatiques - retenir une grande quantité de produits (69).

Dans ce cas, le dosage du médicament dans le sang perd sa valeur en tant qu'indicateur de la concentration réalisée dans l'organisme et ne fournit pas de résultat en rapport avec l'effet thérapeutique.

Si cette liaison avec les protéines tissulaires et avec les protéines plasmatiques est suffisamment solide, l'excrétion pourra devenir négligeable. Nous citerons ici, à nouveau, l'exemple de la Suramine. Ce médicament, nous l'avons vu, est lié si intimement aux protéines plasmatiques qu'il se trouve entraîné lorsque celles-ci précipitent. Grâce à cette propriété, la Suramine échappe à l'excrétion et manifeste son activité dans l'organisme pendant plusieurs mois.

Mais, en général, la fraction liée est en équilibre avec la fraction libre et la liaison à la protéine est assez labile. C'est ainsi que la fraction libre diminuant, la liaison se rompt pour permettre un nouvel équilibre. Peu à peu, la fraction liée diminue au profit de la fraction circulante active.

De toute manière, l'importance de la fraction liée d'un médicament a une répercussion sur la durée de l'activité de la drogue.

5) La fixation protéique des médicaments intervient-elle dans une sensibilité ou une résistance normale de l'organisme à ces médicaments?

On n'a pas recherché de façon systématique si la capacité de liaison des protéines plasmatiques variait dans certaines affections et pouvait expliquer des sensibilités ou des résistances individuelles anormales. Mais il résulte de quelques observations que l'affinité

des protéines peut varier.

D'abord, si la plupart des médicaments se lient à un taux identique aux protéines plasmatiques de l'homme, du boeuf ou du cheval, la capacité de liaison est parfois différente selon les animaux. Il faut donc être très prudent dans les extrapolations.

Comme exemple des plus significatifs, rappelons l'affinité particulièrement puissante du sérum de lapin vis-à-vis de l'atropine et de la pilocarpine (108).

D'autre part, quelques liaisons protéiques ont été examinées chez l'homme sain et chez le malade: c'est ainsi que le sérum d'un asthmatique hypersensible a été reconnu comme liant moins l'aspirine qu'un sérum normal. Dans la maladie amyloïde, le pouvoir de liaison est abaissé vis-à-vis de nombreuses substances (in 61).

En résumé, beaucoup de substances existant dans l'organisme et un très grand nombre de médicaments circulent dans le plasma liés en partie à l'albumine. La fraction liée est parfois inactive et ne peut en tous cas dialyser; donc, elle ne passe pas dans le liquide céphalo-rachidien et ne peut être excrétée par filtration glomérulaire.

Enfin, la fraction liée rétablit l'équilibre plasmatique au fur et à mesure que la fraction libre disparaît. Elle joue ainsi un rôle important dans la durée des effets thérapeutiques.

II - LE TRANSPORT DES SUBSTANCES ORGANIQUES ET MINÉRALES PAR LES GLOBULES ROUGES.

=====

.. Dès 1901, EHRLICH (in 95) avait, dans un ouvrage intitulé: "Über den Receptorenapparat der roten Blutkörperchen", émis d'intéressantes considérations sur le rôle probable des hématies; décrivant un grand nombre de récepteurs dans ces éléments figurés, il s'étonnait que les globules rouges n'aient à assurer qu'un simple échange d'oxygène - échange qui est une pure fonction de l'hémoglobine. Cet auteur supposait, en conséquence, que les globules rouges avaient d'autres fonctions encore inconnues, celles de fixer des substances qui ne servaient pas à leurs besoins propres mais devaient être redonnées à d'autres organes. Suivant l'expression propre d'EHRLICH, les globules rouges jouaient le rôle de "greniers".

Mais il semble bien que la répartition inégale entre le plasma et les hématies des substances en circulation ait seulement été aperçue pour la première fois à propos des acides aminés. COSTANTINO en 1913 (d'après 96) observa que les acides aminés existent à une concentration plus élevée dans les globules rouges que dans le plasma.

Cette étude reprise, depuis, de nombreuses fois, a fait l'objet d'un travail détaillé en 1952 (24).

Les recherches sur la répartition érythroplasmatisque des substances naturelles et des médicaments se sont poursuivies particulièrement pendant ces dernières années, et actuellement la valeur du partage entre hématies et plasma est connue pour les substances naturelles et pour la grande majorité des médicaments en usage.

Quelques substances seules ne se fixeraient pas dans les globules rouges. Ex: certains barbituriques (81). Certaines y pénètrent par diffusion et se trouvent ainsi réparties proportionnellement à la richesse en eau.

De nombreux médicaments se trouvent dans les hématies, soit à un taux bien inférieur à celui qu'ils atteignent dans le plasma, soit à un taux nettement supérieur; dans ce dernier cas, il y a accumulation dans les hématies (sulfamides).

Il n'est pas dans notre intention de faire une revue complète de la question. Citons les articles généraux très intéressants de

BROSS-KUBIKOWSKI (19), CORDIER (27), BOULANGER (15). Nous verrons seulement quelques exemples, nous réservant d'indiquer plus tard en détail les résultats concernant les médicaments que nous avons étudiés. Nous choisirons comme exemples des substances très différentes et dont la fixation sur les hématies présente un intérêt tout particulier.

- L'adrénaline: L'adrénaline est connue pour perdre rapidement son activité dans le sang. On a pensé que le produit s'oxydait. Il y a plus, l'adrénaline est résorbée et emmagasinée par les globules rouges. Ce fait s'explique aisément si l'on songe à la grande surface d'adsorption des globules rouges qui représente chez l'homme environ 3.000 m^2 (19) (les protéines plasmatiques occuperaient 125 à 140.000 m^2 (d'après 95)). L'adrénaline est fortement liée, car elle ne peut manifester ses propriétés qu'après hémolyse. Si on injecte à des animaux une solution où des hématies imprégnées d'adrénaline ont été hémolysées, on observe une augmentation de la pression sanguine. Au contraire, les globules non hémolysés ne produisent aucun effet. (85).

- La quinine: la répartition de la quinine a été étudiée à plusieurs reprises. Nous ne citerons que les travaux les plus récents.

Confirmant l'opinion d'autres auteurs, de FABRE en particulier, QUEVAUVILLER (90) a montré que la quinine se fixe électivement sur les hématies: dans le sang de porc défibriné, le rapport érythroplasmatique varie de 1,5 à 2.

Les chiffres obtenus par DEQUIDT (34) dans des conditions expérimentales particulières sont également très voisins de 2.

De leur côté, CARLSON et CRETCHER (22) l'ont trouvé égal à 2,3.

Chez l'animal (chien), HIATT et QUINN (69) indiquent 1-1,9.

Par ailleurs, la fixation de la quinine à la surface de l'hématie a été mise en évidence d'une façon remarquable au cours de recherches microscopiques par SEABRA (101).

- Les antibiotiques: La plupart des antibiotiques se fixent partiellement sur les hématies. La Pénicilline en est le meilleur exemple (10)(102).

- Le plomb: dans le sang, 90% du plomb est contenu dans les hématies, quelle que soit la quantité totale (d'après 106).

I) Importance de la répartition érythroplasmatique:

A- Dans l'interprétation des analyses:

a) Le plus souvent on détermine la quantité de substance étudiée contenue dans les globules rouges à l'aide de deux dosages: l'un effectué sur le sang total, l'autre sur le plasma.

Le rapport érythroplasmatique calculé est égal alors à :

Concentration par litre de globules rouges:

Concentration par litre de plasma.

Mais en considérant des substances diffusibles, il a paru plus exact, à certains, de tenir compte que l'eau occupe dans les globules un volume beaucoup moins important que dans le plasma, et en conséquence de calculer la répartition érythroplasmatique, non pas en fonction d'un volume donné de globules rouges et de plasma, mais en fonction d'un même volume d'eau. Cette façon d'opérer conduit évidemment à modifier certains rapports.

Prenons l'exemple de l'urée:

le rapport concentration par litre de globules rouges est égal concentration par litre de plasma à l'unité ou légèrement inférieur (suivant les auteurs). Si on établit ce rapport en fonction de l'eau des deux phases, il devient très peu différent de 1,14 (91); si bien que l'urée doit être considérée comme s'accumulant dans les hématies, sans qu'on ait encore trouvé par quel moyen de fixation (adsorption ou union chimique?).

Le mode de calcul basé sur une répartition dans l'eau du plasma et des globules a également conduit à une répartition un peu différente des sulfamides (109) (67) (75).

b) La plupart des constituants du sang et des médicaments se trouvent à une concentration différente dans les hématies et dans le plasma (ou le sérum). Or, dans les analyses chimiques du sang, on néglige souvent les éléments figurés, et on considère le plasma ou le sérum comme le sang complet ou bien encore on opère indifféremment sur le sang total et le plasma.

Cette habitude expose à deux sortes d'erreurs suivant qu'il s'agit de constituants normaux ou de médicaments.

- Dans le premier cas, les analyses faites sur le plasma ou sur le sang total peuvent donner des résultats différents et une interprétation exacte de ces résultats doit tenir compte d'une répartition inégale; malheureusement, cette explication n'est pas toujours donnée. Il en résulte certaines confusions.

- Dans le deuxième cas, le dosage des médicaments dans le sang a généralement pour but de contrôler le taux sanguin dont dépend l'effet thérapeutique. Or, ces analyses se pratiquent très souvent sur le plasma ou le sérum qui ne contiennent qu'une partie du médicament quand celui-ci est emmagasiné dans les hématies qui le relâcheront peu à peu. De telles analyses sont donc incomplètes. On pourra s'étonner alors que des effets thérapeutiques soient encore observés alors que le produit a pratiquement disparu du plasma. Ce cas se rencontre fréquemment pour les antibiotiques, Pénicilline, par exemple (72).

B - Dans l'activité thérapeutique:

Tous les auteurs qui, après EHRLICH, se sont intéressés à la fixation globulaire de diverses substances ont considéré les hématies comme des "entrepôts mobiles", pour reprendre l'expression de SBARSKY (96); ce qui traduit bien le rôle joué par les hématies dans le transport et la régularisation des substances actives. D'ailleurs, on a parfois utilisé les hématies comme "procédé retard" pour maintenir justement pendant assez longtemps un taux actif de médicament (102).

C - Dans la rétention tissulaire:

La fixation importante dans les globules rouges, considérée comme une image de la rétention tissulaire, permettrait d'envisager un stockage éventuel au niveau des organes. Ce point de vue cependant est assez discuté.

2) Y a-t-il une relation entre la fixation de médicaments aux protéides
plasmiques et leur fixation aux hématies?

Laissant de côté la liaison protéique, en tant qu'obstacle à la pénétration du médicament dans les globules rouges, il nous semble que les deux fixations, protéiques et globulaire, pourraient être rapprochées.

On pourrait se demander, en effet, si la liaison aux micelles protéiques ne serait pas du même ordre que la fixation sur les éléments figurés?

- PREMIERE PARTIE -

=====

ETUDE

DES

SULFAMIDES.

GENERALITES SUR LA LIAISON PROTEIQUE ET SUR LA REPARTITION
ERYTHROPLASMATIQUE DES SULFAMIDES.

Les sulfamides ont en commun le noyau du sulfanilamide et portent des chaînes ou d'autres noyaux qui leur confèrent des propriétés différentes de celles du sulfanilamide. Ces substitutions modifient en particulier:

- la solubilité qui dépend principalement, selon certains, du degré d'ionisation.

- la constante de dissociation (p K) qui jouerait un rôle dans l'activité des sulfamides (4) (39, (40) (89) (98).

Voici, d'après FOX et ROSE (52), le p K de quelques sulfamides et leur solubilité dans l'eau et dans une solution tamponnée phosphatée.

	p K	Solubilité en mg/100 cm ³ dans:	
		eau à 37°	Solution tamponnée à pH 7,4
Sulfanilamide	10,5	1.400	1.720
Sulfapyridine	8,5	49,5	75
Sulfathiazol	6,8	94	248
Sulfadiazine	6,4	12,3	167

Le p K et la solubilité de tous les sulfamides sont connues (4) (39) (44).

Les auteurs sont d'accord pour reconnaître l'importance du pH dans la solubilité et pour constater que la solubilité des sulfamides dans le plasma et dans les urines est plus grande qu'en milieu aqueux (89).

Voici les solubilités trouvées dans les urines acides et alcalines à des pH déterminés pour différents sulfamides (44).

Solubilité en mg/100 cm³

	Urine acide		Urine alcaline	
		pH		pH
Sulfapyridine	39	5,4	89	8,2
Sulfathiazol	102-110	5,5	310-359	7,9-8,2
Sulfadiazine	16-18	5,5-6	52-165	7,5-7,9
Sulfamirazine	37-38	6	160-200	7,5-7,9

D'une façon générale, les sulfamides sont très solubles en milieu alcalin.

I) Etude d'une liaison sulfamide-protéine:

DEROUAUX (39) a consacré un important mémoire à l'étude de cette liaison.

Parmi les nombreuses indications que nous avons trouvées sur le même sujet, (2) (6) (31) (32) (33) (39) (44) (58) (89), nous citerons les chiffres rapportés par DRILL.

Pourcentage lié aux protéines en fonction de la concentration.

	5 mg/100 cm ³	10 mg/100cm ³ de plasma
Sulfanilamide	10	20
Sulfaguanidine	6	25
Sulfacétamide	13	20
Sulfathiazol	60	55-75
Sulfapyridine	31	40
Sulfadiazine	17	32-56
Sulfapyrazine		50
Sulfamérazine	39	60-80
Sulfaméthazine		60-80

Comme on le voit, la fraction liée dépend de la concentration du sulfamide et de sa nature.

Que les expériences soient menées in vitro ou in vivo, le taux de fixation du sulfamide est pratiquement identique (58).

On a pu établir un rapport entre la solubilité des sulfamides et leur capacité de liaison aux protéines. On a également envisagé une corrélation entre le pourcentage de liaison et le pourcentage d'ionisation à un pH considéré: relation, au fond, à peu près semblable à la précédente, le pH intervenant dans la solubilité (32) (39).

A - Preuve de la liaison protéique des sulfamides:

Elle a été acquise:

- par des expériences in vitro de dialyse, d'ultrafiltration, (d'après 58), ou d'électrophorèse (74) (99). Ce dernier procédé montre que les sulfamides se lient à l'albumine. On ne décèle que des traces avec les globulines.

- par des observations in vivo concernant le passage du médicament dans les liquides biologiques.

a) Passage dans le liquide céphalo-rachidien.

L'étude du passage de la barrière hémoméningée a montré que les sulfamides se comportent de façon très différente. La concentration dans le liquide céphalo-rachidien dépend de la quantité de sulfamide liée aux protéines plasmatiques (2) (3) (31) (36 à 39) (54) (89), sans qu'il y ait cependant parallélisme exact (36).

Voici, extraits du Travail de DEROUAUX (39), quelques chiffres:

	% de passage dans L.C.R.	Fraction ultrafiltrable %
Sulfanilamide	81	93,4
Sulfacétamide	70	88,8
Sulfapyridine	68	69
Sulfadiazine	28	58
Sulfathiazol	9	36,5
Sulfaéthyl- thiodiazol	0,85	2

b) Passage dans le sang foetal:

Alors que le sulfanilamide se rencontre dans le sang foetal à la même concentration que dans le sang maternel, la sulfapyridine et le sulfathiazol, par exemple, ne s'y trouvent qu'à une concentration égale à $1/3 - 3/5$ de leur concentration sanguine (2) (3).

c) Taux sanguin élevé:

Une autre observation est également en faveur d'une liaison protéique.

On constate que certains sulfamides se trouvent dans le sang à une concentration plus élevée qu'ils ne devraient l'être si ces sulfamides étaient répartis dans toute l'eau corporelle. Ce taux est d'autant plus fort que le médicament est davantage lié, si bien que pour des doses identiques absorbées par voie orale de sulfadiazine, sulfaméthazine et sulfamérazine, par exemple, on doit s'attendre à un niveau supérieur pour les deux derniers (58).

B - Nature de la liaison:

Les deux expériences suivantes ont été réalisées (2):

- une solution de sulfamide est ajoutée à un plasma humain et soumise à l'ultrafiltration;
- La même solution est mise en contact avec du charbon animal, puis filtrée.

Les quantités de substance retenues dans les deux cas montrent une similitude du phénomène. Il s'agit donc certainement dans le premier cas d'une adsorption.

Les sulfamides sont d'autant moins retenus par le plasma, comme nous l'avons dit, qu'ils sont plus solubles (ainsi, le sulfanilamide l'est 3 fois moins que la sulfapyridine, 7 fois moins que le sulfa-thiazol), mais la rétention sur charbon est plus marquée pour tous les sulfamides. L'expérience de KINTIG et WESELMANN (14) (voir p. 7), prouve encore cette adsorption du sulfamide, puisque la liaison protéique est rompue par le charbon animal.

C - Formes acétylées et liaison protéique:

L'acétylation des dérivés aminés figure parmi les mécanismes de détoxication de l'organisme.

Les sulfamides subissent chez l'homme une acétylation partielle. Le degré d'acétylation varie avec chaque sulfamide.

Les sulfamides à diffusion rapide, donc peu liés aux protéines plasmatiques, subissent l'acétylation dans une plus forte proportion que les sulfamides à diffusion lente, à liaison protéique importante.

L'acétylation des sulfamides a pu être considérée comme un moyen de défense puisque les composés les plus toxiques seraient les plus acétylés (le sulfathiazol qui se conjugue moins que le sulfaméthylthiazol ou la sulfapyridine est aussi deux fois moins toxique, mais il n'y a pas de relation exacte (39) (53).

Les formes acétylées se lient davantage que les formes libres (44) (54) (58) (64).

Voici des résultats publiés par DAVIS et WOOD (33) :

Pourcentage de drogue liée par g. de protéine		
	Forme libre	Forme acétylée
Sulfanilamide	3,3	7,5
Sulfapyridine	13,6	20
Sulfathiazol	39	65

2) Répartition érythroplasmatique:

La répartition érythroplasmatique des sulfamides a fait l'objet de nombreuses études in vitro et in vivo (32) (54) (58) (64) (67) (89) (93) (103) (104) (109).

Il est acquis que tous les sulfamides se répartissent dans le sang entre les hématies et le plasma.

Lorsque la répartition est étudiée in vitro, la plupart des auteurs laissent le sang et le sulfamide en contact un certain temps; en réalité, la réaction est instantanée, comme l'a observé HEINEMANN (67) (et comme nous l'avons vérifié dans nos recherches personnelles).

Des expériences de diffusion dans l'agar-agar ou la gélatine ont donné des résultats s'accordant bien avec la pénétration des sulfamides dans les hématies (66).

Nous citerons comme exemple de répartition, celle indiquée par FRISK (54) en nous limitant à quelques sulfamides.

Répartition du Sulfamide total et du Sulfamide libre entre le plasma (Pl) et les globules rouges (G.R.)	Variation du pourcentage de Sulf. total		Variations du pourcentage de Sulf. libre		Rapports	
					Sulf. total G.R.	Sulf. libre G.R.
	Pl	G.R.	Pl.	G.R.	Sulf. total Pl	Sulf. libre Pl
Sulfanilamide	31-49	51-69	44-60	40-56	1,36-2,36	1,08-1,60
Sulfaguanidine	33-60	40-67	26-65	35-74	0,89-1,90	0,81-2,45
Sulfathiazol	68-86	14-32	71-84	16-39	0,19-0,49	0,27-0,72
Sulfaméthylthiazol	78-100	0-22	77-100	0-23	0-0,34	0-0,59
Sulfapyridine	75-83	17-43	50-67	24-50	0,28-0,90	0,51-1,32

Ce tableau montre qu'un sulfamide très soluble, le sulfanilamide se trouve en quantité plus grande dans les hématies que dans le plasma, tandis que des sulfamides très peu solubles pénètrent peu dans les hématies.

La distribution érythroplasmatique pourrait, semble-t-il, dépendre du degré de liaison des sulfamides aux protéines, d'autant plus qu'il y a un certain parallélisme entre le passage des sulfamides dans le liquide céphalo-rachidien et le passage dans les globules rouges.

Il y a une relation entre le degré d'acétylation et la distribution érythroplasmatique: les sulfamides qui sont localisés surtout dans le plasma sont moins acétylés que les sulfamides qui se répartissent également ou se trouvent en plus grande quantité dans les globules.

La répartition de la forme acétylée semble être ici assez voisine de la répartition de la forme libre, dans d'autres expériences elle se montre très différente (53) (83).

Le rapport érythroplasmatique est susceptible de varier. GILLIGAN (58) a trouvé une grande variabilité in vivo et in vitro. Les résultats empruntés à FRISK, que nous avons fait figurer ci-dessus, dénoncent aussi une certaine variation.

Au cours de traitements, on a observé des modifications portant surtout sur la forme conjuguée (d'après 44); l'emploi du sulfanilamide dans certains cas a paru s'accompagner d'échecs quand il y avait un rapport érythroplasmatique élevé du sulfamide conjugué (65); enfin, la perméabilité des hématies (de même que la perméabilité de la barrière hémoméningée et la perméabilité des tissus) est augmentée dans certaines affections (68).

3) Répartition tissulaire des sulfamides:

Quelques sulfamides se répartiraient à peu près également entre les tissus et le plasma, tel serait le cas du sulfanilamide, de la sulfapyridine et de la sulfapyrimidine, mais le plus souvent la ré-

partition est inégale (54) (79) (80) (89) (109) (113).

Il est difficile de comparer des résultats obtenus dans des conditions fort variées. CROSNIER, dans une monographie (29) indique que la fixation serait la plus élevée dans les glandes (foie surtout), moins importante dans les centres nerveux mais encore supérieure à la concentration sanguine. La fixation la plus faible se ferait dans les poumons, la graisse, les os, la peau, les nerfs périphériques. En fait, la répartition tissulaire paraît très variable (1).

Cependant, nous remarquons dans le travail d'HERBERTS (68) sur la sulfapyridine que le poumon est l'organe le plus riche. De même, dans des expériences de MARSHALL et LICHTFIELD (80) sur des chiens, le poumon se montre encore comme ayant, en général, la plus forte concentration. La répartition se ferait alors, semble-t-il, suivant la quantité d'eau de chaque tissu, sauf pour le foie et peut-être le poumon.

Nous avons relevé ces détails parce que nous verrons justement à propos de la Chlorpromazine, que les poumons apparaissent fréquemment comme le tissu emmagasinant le plus de médicament.

4) Excrétion des sulfamides:

En raison de leur faible clearance, on a souvent considéré que les sulfamides étaient éliminés par simple filtration glomérulaire. En réalité, les fractions filtrables de sulfathiazol et de sulfaméthylthiodiazol ne sont pas assez importantes pour correspondre aux clearances observées. On peut donc en conclure que ces médicaments sont aussi partiellement excrétés par les tubes.

Il ne semble pas y avoir de relation entre la valeur à laquelle les sulfamides sont excrétés et la distribution érythroplasmatique. Deux cas pourtant méritent d'être cités (54): le sulfaméthylthiodiazol qui se trouve localisé entièrement ou presque dans le plasma est très rapidement excrété, alors que le N¹-méthyl-acrylsulfamide, plus concentré dans les globules rouges est excrété quatre fois moins.

5) Importance thérapeutique de la liaison des sulfamides aux protéines et de leur répartition érythroplasmatique.

1) In vitro, le sulfamide lié aux protéines plasmatique n'a pas d'activité bactériologique (32) (33).

La grande variation du degré de liaison, suivant les sulfamides, impose au clinicien la connaissance du taux plasmatique à atteindre pour garantir l'efficacité d'un sulfamide donné.

Par exemple, la sulfapyridine qui se lie moins aux protéines que le sulfathiazol se montre à dose égale, plus active que ce dernier, pourtant doué de propriétés bactériostatiques plus importantes (44).

Par ailleurs, on administre des doses plus élevées de sulfaméthazine et de sulfamérazine que de sulfadiazine pour maintenir une même concentration de drogue libre dans le plasma.

2) L'affinité d'un sulfamide pour les protéines plasmatiques limite sa répartition dans l'organisme (31) (38) (39). Il en résulte deux conséquences:

- D'abord, la pénétration dans la cellule hépatique est réduite; de ce fait, l'acétylation, qui très probablement a lieu dans le foie, serait diminuée.

- D'autre part, l'élimination se trouve être d'autant plus prononcée que la liaison est plus importante. On explique ceci par la répartition plus lente du sulfamide, une concentration plus élevée dans le sang entraînant une élimination accrue.

3) Il est prouvé que la cyanose arrivant en cours de traitement sulfamidé est provoquée par un composé instable (carbohémo-globine + sulfamide). FRISK (54) pense que les concentrations différentes des sulfamides dans les hématies pourraient expliquer les différents degrés de cyanose observés:

En effet, les traitements par les sulfamides à haute concentration globulaire s'accompagnent souvent de cyanose.

Au contraire, la cyanose est rare dans le cas d'une faible concentration globulaire.

EXPERIMENTATION PERSONNELLE SUR LES SULFAMIDES

I- Généralités

- Les sulfamides utilisés
- Le sang utilisé
- Technique du dosage
- Etude de la réaction colorée

II- Influence de divers facteurs susceptibles de modifier la répartition érythro-plasmatique

- Le pH
- L'agitation
- La durée de contact in vitro du sulfamide et du sang
- La nature du sang utilisé
- L'hématocrite
- La substitution du plasma dans le sang
 - son remplacement par l'eau physiologique
 - son remplacement par la polyvinylpyrrolidone (subtosan)
- La concentration du sulfamide dans le sang.

III- Etude critique de la répartition érythro-plasmatique du Sulfafurazol utilisé sous sa forme médicamenteuse la Gantrisine.

Généralités

- Influence de l'hydrolyse
- Influence de l'hématocrite et de la concentration en sulfafurazol sur le taux retrouvé dans le sang
- Influence des conditions de la défécation
 - Contrôle de la défécation employée
 - Importance de la dilution utilisée
 - Modifications apportées par l'hémolyse
- Etude in vivo - analyse de sangs de malades
- Solubilités comparées du sulfathiazol et du sulfafurazol
- Répartition tissulaire in vitro du sulfafurazol et du sulfanilamide
- Le sulfafurazol est-il lié aux protéines plasmatiques?
 - essais de dialyse
 - en sac de collodion
 - en sac de cellophane.

I - GENERALITES -

Les sulfamides utilisés.

Les sulfamides groupent actuellement un ensemble de corps dérivés du sulfamide initial (le sulfanilamide) qui doit son activité au groupement SO_2NH_2 situé en position para par rapport à un groupement aminé (NH_2) sur un noyau benzénique.

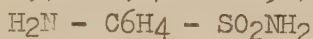
Voici les sulfamides que nous avons utilisés dans nos expériences.

Sulfanilamide:

p-amino-phénylsulfamide

nom déposé: Exoseptoplix ou II62 F SPECIA

(Solubilité: 0,7 à 0,8% à + 15°)

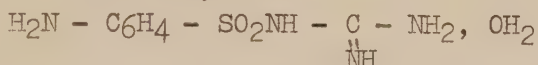


Sulfaguanidine:

p-amino-phényl-sulfonyl-guanidine

nom déposé: Ganidan SPECIA

(Solubilité : 0,1 % à + 15°)

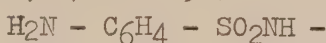


Sulfapyridine:

p-aminophényl-sulfamido-pyridine

nom déposé: Dagénan SPECIA

(Solubilité: 0,02% à + 15°)

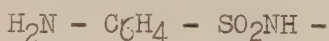


Sulfathiazol:

p-amino-phényl-sulfamido-thiazol

nom déposé: Thiazomide SPECIA

(Solubilité: 0,06 % à + 15°)

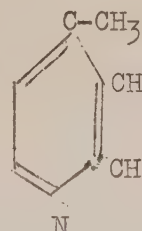
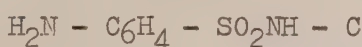


Sulfamérazine:

p-amino-phényl-sulfamido-méthyl-pyrimidine

nom déposé: Sumédine SPECIA

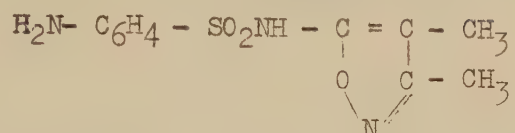
(Solubilité: 0,03 % à + 37°)



Sulfafurazol:

Diméthylsulfamido-isoxazole.

nom déposé: Gantrisine ROCHE.



Les dénominations utilisées au cours de cette étude, ont été en général le nom chimique. Nous avons cependant rappelé souvent le nom de la spécialité qui servait à nos essais, d'une part, parce qu'il est plus connu et, d'autre part, parce que les deux appellations ne sont pas, parfois, absolument identiques.

Le sang utilisé.
=====

Nous avons utilisé dans tous nos travaux sur les sulfamides.
un sang destiné à la transfusion.

Il nous a été très utile de pouvoir disposer ainsi de grandes quantités de sang qui représentait pour nous un échantillon homogène et constant. Ce matériel biologique périmé nous a été fourni avec une complaisance que nous avons beaucoup appréciée. Jamais sans cette possibilité, nous n'aurions pu pratiquer nos essais en série, comme nous l'avons fait bien souvent.

Sa conservation:

Le sang humain destiné à la transfusion a été recueilli en flacon stérile et conservé sur un mélange anticoagulant qui répond à la formule suivante:

<u>Soluté anticoagulant</u>	A C D
Citrate de sodium	1 g 33
Acide citrique	0 g 47
Glucose	3 g
pour 100 cm ³	

Ce sang est simplement homogénéisé par agitation au moment de l'emploi.

Technique suivie pour le dosage des sulfamides

La technique suivie est celle de BRATTON et MARSHALL (16).
Voici son principe:

Principe:

La fonction amine libre des sulfamides est diazotée par action du nitrite de sodium en milieu acide et le diazoïque obtenu est copulé avec une amine ou un phénol pour donner un azoïque très coloré.

La défécation du sang:

La dilution du sang se fait en général au 1/20 - soit 30 cm³ d'eau distillée pour 2 cm³ de sang total. Après 15 minutes (temps suffisant à l'hémolyse), on ajoute 8 cm³ de CCl₃COOH à 15 p.100 - on agite fortement et on filtre.

Pour doser le sulfamide libre, on effectuera la réaction directement sur ce filtrat.

Pour doser le sulfamide total, le dosage sera précédé d'une hydrolyse chlorhydrique pour désacétyle le sulfamide conjugué.

La réaction colorée:

On ajoute successivement à 10 cm³ de solution sulfamidée déprotéinisée par l'acide trichloracétique

1 cm³ de nitrite de sodium en solution à 1 p.1000

1 cm³ de sulfamate d'ammonium à 5 p.100 pour détruire l'excès de nitrite,

1 cm³ de solution d'amine (le chlorhydrate de naphtyldiéthylpropylénediamine à 1 p. 1.000).

Après agitation, la coloration rose qui se développe atteint son maximum après quelques minutes. Elle reste stable plusieurs heures à l'obscurité.

La lecture se fait dans le vert à une longueur d'onde voisine de 520 mμ

Etude de la réaction colorée
=====

I - Fidélité de la méthode:

La réaction est fidèle. Il est possible d'étalonner un photocolorimètre et de se référer ensuite à la courbe établie à l'aide d'une solution témoin de sulfamide.

Nous avons cependant, à chacun de nos dosages, préparé quelques tubes témoins pour contrôler l'exactitude de nos expériences.

II - Intensité de la réaction colorée en fonction du sulfamide:

Nous avons préparé des gammes colorées avec tous les sulfamides utilisés et il nous a paru intéressant de comparer l'intensité de la réaction obtenue dans les différents cas.

La plupart des sulfamides que nous avons employés ont déjà fait l'objet de nombreuses études, celle de FASCIAUX (50) en particulier.

Aussi, n'avons-nous fait figurer, à titre d'exemple (Graphique p.28), que les courbes correspondant, d'une part, au Sulfanilamide (II62 F ou Exoseptoplix) qui nous sert d'étalon et, d'autre part, au sulfafurazol (Gantrisine), sulfamide récent, auquel nous avons consacré une expérimentation toute particulière.

Nous avons remarqué qu'à concentration égale, de tous les sulfamides étudiés, l'Exoseptoplix est celui qui fournit la réaction colorée la plus intense. Prenant ce dernier comme référence, nous lui avons comparé les autres sulfamides en établissant, d'une part, le rapport des poids moléculaires, d'autre part, celui des colorations.

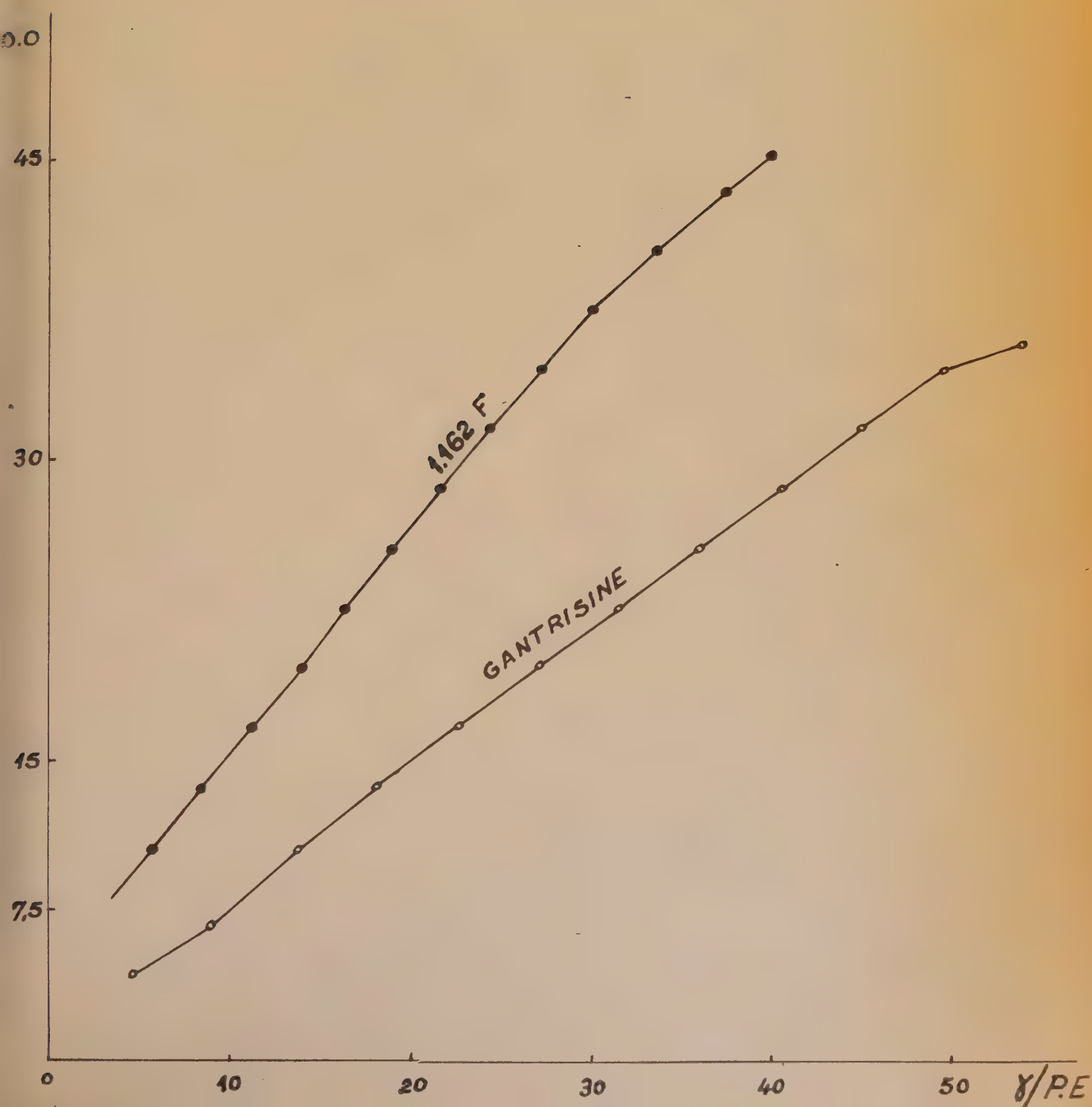
Voici les résultats obtenus pour une prise d'essai contenant 0,03 mg de produit.

Dans la P.E.:0,03mg	Sulfapyridine	Sulfathiazol	Sulfaguanidine	Sulfamérazine	Sulfanilamide (Exoseptoplix) (II62 F)
P.M.	249,3	255,3	232,3	250	172,2
Rapport $\frac{P. M}{P.M II62F}$	1,44	1,48	1,35	1,45	1
Densités optiques x 100	35	33	36	32,8	46,8
Rapport des colorations (Rapport des D.O.)	1,34	1,42	1,30	1,42	1

DOSAGE PHOTOCOLORIMETRIQUE

de L'EXOSEPTOPLIX et de la GANTRISINE

par la méthode de MARSHALL



Les valeurs très voisines obtenues en faisant le rapport des P.M. ou le rapport des colorations semblent indiquer qu'à concentration exactement équimoléculaire, les réactions colorées seraient presque identiques. En effet, nous avons obtenu par exemple, avec la sulfaguanidine, le sulfathiazol et le sulfanilamide (II62 F) en solution équimoléculaire, des densités optiques ($\times 100$) pratiquement identiques: 91,5 - 91,6 - 92, pour une certaine concentration.

Dans les cas envisagés, le poids du sulfamide règle donc l'intensité de la réaction colorée. La pente des courbes de coloration est différente pour chaque sulfamide. A concentration moléculaire équivalente, les densités optiques sont voisines, et d'autant plus que les quantités mises en expérience sont plus faibles.

II - INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER

LA REPARTITION ERYTHROPLASMATIQUE.

Influence du pH sur la répartition érythro-plasmatique des sulfamides.

Voulant comparer la répartition érythroplasmatique de sulfamides très différents dont certains ne sont solubles qu'en milieu suffisamment acide, nous avons recherché avec^{le} sulfanilamide soluble en milieu neutre, si une certaine acidité (nécessaire pour solubiliser d'autres sulfamides), ne modifiait pas la répartition érythroplasmatique.

Nous avons réalisé deux essais in vitro de fixation érythroplasmatique du II62 F: l'un en solution physiologique (I) pH : 6,4

l'autre en solution acidifiée à l'aide de 2 cm³ HCl pur p. I000 (2) pH : 6.

45 cm³ de sang sont additionnés de 5 cm³ de chaque solution de sulfanilamide.

La concentration en sulfamide est de I00 mg par litre.

3 prélèvements sont effectués: le premier au temps 0, les suivants après 2 heures et 8 heures.

Dosage sur 2 cm³ de plasma contenant au départ 0,2 mg de sulfamide.

	Temps	Solution (I)	Solution (2)
mg trouvés	0	I60	I62
dans	2 h.	I62	I62
2 cm ³ .	8 h.	I72	I66

La répartition érythro-plasmatique est identique dans les 2 solutions.

En outre, nous remarquons une répartition immédiate du sulfanilamide entre les hématies et le plasma, observation que nous allons contrôler dans d'autres essais (page 32).

Influence de l'agitation sur la répartition érythro-plasmatique
des sulfamides.
=====

Nous avons mené ces essais sur le sulfanilamide (Exoseptoplix) et sur le sulfafurazol (Gantrisine), que nous avons étudié plus particulièrement à la fin de ce chapitre (p. 44).

Comme dans l'expérience précédente, 45 cm³ de sang total sont additionnés de 5 cm³ de solution de chacun des sulfamides (concentration réalisée = 100 mg p. 1000).

Deux essais différents sont menés simultanément, l'un d'eux est soumis à une agitation mécanique continue.

Après plusieurs heures, l'analyse simultanée du plasma après centrifugation de tous les essais, a donné les résultats suivants:

Concentration en mg par litre de plasma

Sulfanilamide (Exoseptoplix)		Sulfafurazol (Gantrisine)	
non agité	agité	non agité	agité
55	53,7	162	160,5

Le répartition érythro-plasmatique
des sulfamides n'est pas modifiée
par l'agitation.

Influence de la durée de contact sur la répartition érythro-
plasmatisque du sulfamide dans le sang.
=====

I- Expériences réalisées avec le sulfanilamide:

1)- Dans les 2 essais (rapportés page 30), concernant l'influence éventuelle de l'acidité réalisée dans certaines expériences sur la répartition érythro-plasmatisque, les dosages de sulfanilamide effectués à des temps variant de 0 à 8 heures montrent que le partage du sulfamide entre les hématies et le plasma se fait instantanément et que les concentrations plasmatiques et globulaire sont pratiquement identiques durant l'expérience, soit 8 heures dans le cas considéré.

Etant donné l'hématocrite du sang utilisé:

Globules rouges : 360

Plasma: 640

La répartition immédiate est égale à :

Par litre de globules rouges: 135 mg

Par litre de plasma: 80 mg

2)- Voici les résultats obtenus sur 2 autres sangs. La concentration finale est de 100 mg par litre. Les essais ont été menés en double et désignés sous les lettres A et B.

Concentration en mg par litre:

Temps	Sang 1				Sang 2			
	Plasma		G.R.		Plasma		G.R.	
	A	B	A	B	A	B	A	B
0	77,5	77,5	142	141	76,5	77	160	161
2h	82	77,5	148,5	146,5	76,5	72,5	150	151,5
9h.	86	86	149,5	153,5	84,5	82,5	148	147

II - Expériences réalisées avec la Sulfapyridine (Dagénan et Soludagénan) et le Sulfafurazol (Gantrisine)

La concentration réalisée dans les sangs est de 100 mg par litre. Les prélèvements ont été effectués aux temps 0 et 2 heures. Les essais ont été faits en double. La concentration globulaire a été obtenue par dosage dans les globules rouges eux-mêmes et non par différence à partir du taux plasmatique.

Concentration en mg par litre aux temps

		0	2 h.
Dagénan	Globules Plasma	100 83,7	101 83,8
Soludagénan	Globules Plasma	100 87,3	100 86,8
Gantrisine	Globules Plasma	45 103,5	45,7 103,85

La répartition érythroplasmatisque de tous les sulfamides utilisés est la même dans des prélèvements faits à des temps différents.

En conséquence, dans toutes les expériences que nous allons rapporter, les analyses seront effectuées au temps 0, c'est-à-dire aussitôt après avoir homogénéisé le sang auquel aura été ajouté le sulfamide.

Influence du sang utilisé
=====

Nous nous étions demandé si avec des sangs différents nous obtiendrions une répartition érythro-plasmatique différente.

Dans les expériences que nous venons de rapporter, les résultats obtenus avec des sangs destinés à la transfusion sont pour un même sulfamide remarquablement voisins, sinon identiques. Il en est de même dans les deux analyses figurant p. 35 .

En conclusion, la répartition des sulfamides n'est pas influencée par l'échantillon de sang utilisé. Il faut ajouter que, dans ces différents cas, il s'agissait de sangs destinés à la transfusion, mais dont les hémato-crites différaient fort peu entre eux.

Influence de l'hématocrite des sangs utilisés sur la répartition
érythro-plasmatique des sulfamides.

Ces expériences ont été réalisées avec le sulfanilamide (Exoseptoplix) et le sulfafurazol (Gantrisine). Les sangs utilisés sont des sangs de transfusion dont une partie du plasma a été enlevée, si bien que l'hématocrite de ces sangs concentrés se trouvait respectivement égal à

	Sang 1	Sang 2
Globules rouges	620	610
Plasma	380	390

Nous avons effectué trois essais:
L'un sur ces sangs à hématocrite élevé, et 2 autres sur ces mêmes sangs dont l'hématocrite a été artificiellement abaissé par addition de solution physiologique, soluté isotonique de ClNa.

Nous avons donc finalement obtenu les trois hématocrites suivants:

Globules rouges	620-610	410-410	310-310
Plasma	380-390 (1)	590-590 (2)	690-690 (3)

La concentration réalisée en sulfamide était celle de 100 mg par litre. Voici nos résultats: Les chiffres 1, 2 et 3 correspondent aux valeurs des hématocrites ci-dessus. Nous avons calculé la concentration globulaire par différence à partir du taux plasmatique.

Concentration en mg par litre

		Sulfafurazol (Gantrisine)						(Sulfanilamide (Exoseptoplix)					
		Sang 1			Sang 2			Sang 1			Sang 2		
	I	2	3	I	2	3		I	2	3	I	2	3
Plasma	I22	97	88	I20	98	88		65	75	73	60	73	72
G.R.	65	78	95	66	76	95		109	115	133	113	119	135
G.R.													
Plasma	0,53	0,8	1,06	0,55	0,77	1,06		1,67	1,53	1,82	1,88	1,63	1,82

Nous constatons que la répartition varie avec l'hématocrite et que la charge des hématies est d'autant plus importante que celles-ci sont moins nombreuses. Ces résultats sont confirmés par les expériences rapportées p.41 et 42. Une observation identique avait déjà été faite par SISE (104).— De plus, nous remarquons que la concentration plasmatique dans le cas de la Gantrisine diminue en même temps que l'hématocrite, si bien que la charge des hématies devient même supérieure à celle du plasma dilué par la solution physiologique.

En résumé,

De tous les essais effectués, il nous faut donc retenir que seul parmi les facteurs étudiés, l'hématocrite est susceptible d'intervenir dans la répartition érythro-plasmaticque d'un sulfamide donné.

Influence de la substitution de l'eau physiologique au plasma
sur la répartition érythro-plasmatique.

Nous avons vu (p. I9) que le passage des sulfamides dans les globules rouges était lié principalement à la concentration plasmaticque en sulfamide libre. Nous avons donc cherché si la répartition érythro-plasmaticque était modifiée en remplaçant le plasma par de l'eau physiologique. Nous avons déjà fait des substitutions partielles du plasma dans les essais précédents lorsque nous voulions abaisser l'hématocrite, mais il nous a paru nécessaire de réaliser ces expériences dans des conditions plus précises.

I- Dans une première série d'expériences, nous avons dilué un sang, d'une part avec le plasma lui-même, d'autre part, avec de l'eau physiologique, réalisant ainsi les trois hématocrites suivants après addition du sulfamide:

Globules rouges	340 (I)	250 (2)	I90 (3)
Plasma	660	750	8I0

Volumes en cm ³ de:		(I)	(2)		(3)	
Sang initial		I0	I0	I0	I0	I0
Plasma			5		I0	
Eau physiologique				5		I0
Solution de sulfamide		1	I,5	I,5	2	2
Concentration en mg par litre	réalisée	90	90	90	90	90
	Trouvée, Gantrisine dans le	98	94	92	92	93
	plasma Exoseptoplix	77	82	82	80	82
	calculée dans les G.R.					
	Gantrisine	74	78	84	8I	777
	Exosepto- plix	II5	II4	II4	I32	I24

II- Dans une deuxième série d'expériences analogue à la précédente, nous avons complètement éliminé le plasma dans les essais contenant l'eau physiologique, c'est-à-dire que nous avons isolé par centrifugation les globules rouges et nous les avons remis en suspension dans l'eau physiologique pour obtenir un hémocrite identique à celui du sang initial. Soit par litre :

Globules rouges620
 Plasma 380

Ensuite, nous avons effectué des dilutions qui nous ont conduit aux hémocrites ci-dessous, après addition du sulfamide:

Globules rouges : 560(1) 370(2) 280(3)
 Eau physiologique: 440 630 720

Concentration en mg. par litre		(1)	(2)	(3)
Trouvée dans l'eau physio- logique	Gantrisine	110	90	90
	Exoseptoplix	74	77	75
Calculées dans les G.R.	Gantrisine	74,2	90	90
	Exoseptoplix	103	112	128

L'influence de l'hémocrite mise à part, il nous est difficile de conclure à une influence nette de la substitution de l'eau physiologique au plasma sur la répartition érythro-plasmatique.

Influence de la substitution de la polyvinylpyrrolidone
(Subtosan) sur la répartition érythro-plasmatique des sulfamides.

La polyvinylpyrrolidone (PVP) que nous avons utilisée est la solution à 35g. p.100 (Subtosan SPECIA). On la substitue au plasma car elle présente avec ce dernier de nombreux points communs. De plus, elle forme des combinaisons avec certaines substances habituellement insolubles dans l'eau, le sulfathiazol en particulier (70) (71).

Nous avons cherché à nous rendre compte si la répartition érythro-plasmatique était modifiée dans ce milieu synthétique.

Nous avons réalisé cette expérience en choisissant à dessein trois sulfamides dont deux solubles: le Soludagénan (Sulfapyridine) et l'Exoseptoplix (Sulfamilamide), le troisième très peu soluble: le Thiazomide (sulfathiazol).

Nous avons effectué deux dilutions répondant respectivement aux valeurs hématocrites suivantes:

Globules rouges	300	(1)	240	(2)
	700		760	

Nous avons mené parallèlement trois essais dans chaque cas: l'un est le sang lui-même.

Le deuxième, ce même sang dont le plasma a été remplacé par l'eau physiologique, et qui nous servira de second témoin.

Dans le dernier, le Subtosan a été substitué au plasma.

Voici les résultats:

Concentration plasmatique en mg. p. 1000.

Concentration réalisée = 90 mg	(1)			(2)		
	Plasma	Eau physiologique	Subtosan	Plasma	eau physiologique	Subtosan
Soludagénan	71,5	64,8	82,8	72,2	67,5	82,8
Exoseptoplix	60	52	88			
Thiazomide	85,5	69,8	81,9	90	81,9	92,7

Pour la sulfapyridine (Soludagenan) comme pour le sulfanilamide (Exoseptoplix), la concentration du sulfamide dans la solution de polyvinylpyrrolidine (Subtosan) est supérieure à celle du plasma. Au contraire, dans le cas du sulfathiazol, il n'y a pas de différence notable entre le Subtosan et le plasma. Mais nous constatons ici dans les trois cas, une diminution notable de la concentration lorsque les globules rouges ont été mis en suspension dans l'eau physiologique.

Influence de la concentration en sulfanilamide
sur sa répartition érythro-plasmatique.

1°) Nous avons utilisé des solutions de sulfanilamide à 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25 g. p. 1000 qui sont ajoutées à dix fois leur volume de sang.

L'hématocrite du sang étudié est:

Globules rouges 470
Plasma 530

Concentrations réalisées en mg par litre de sang total	360	270	180	90	45	22,5
Concentration en mg par litre de plasma	260	185	128	64	34	19
Concentration en mg par litre de G.R.	472	365	238	119	57	26
Rapport des concentrations G.R./Plasma	1,81	1,97	1,85	1,85	1,67	1,36

Le calcul du rapport concentration des G.R. montre que
Concentration du plasma
la charge des hématies en sulfamide est proportionnelle à la quantité de sulfamide ajoutée au sang lorsque la concentration est égale ou supérieure à 90 mg par litre.

Pour des concentrations inférieures, le sulfamide pénètre moins dans les globules rouges.

2°) La répartition paraissant, dans cet essai, se modifier pour de faibles concentrations en sulfamide, nous avons repris l'expérience avec les taux suivants de sulfanilamide 90, 45, 25 mg. p. litre, mais en utilisant un sang dont l'hématocrite est:

Globules rouges 280
Plasma 720

Concentrations réalisées en mg par litre de sang total.	90	45	22,5
Concentration en mg par litre de plasma	60	30	16
Concentration en mg par litre de G.R.	167	83	39
Rapport des concentrations G.R./ plasma	2,78	2,76	2,43

Lorsque la concentration en sulfani-
lamide du sang est abaissée, le rap-
port érythro-plasmatique est également
abaissé.

Etude de la répartition érythro-plasmatique de quelques sulfamides.

Il est intéressant de comparer les concentrations globulaire, et plasmatique obtenues in vitro en employant différents sulfamides.

Voici, par exemple, les résultats d'une expérience réalisée dans ce but.

Concentration en mg par litre:

	Sulfafurazol (Gantrisine)	Sulfapyridine (Soludagénan)	Sulfathiazol (Thiazomide)
G.R.	64	113	86
Plasma	100	81	91

Si nous rapprochons nos résultats de ceux qui ont été obtenus précédemment (pages 41 et 42), nous constatons que le sulfanilamide se concentre à un taux particulièrement élevé dans les G.R.

La sulfapyridine (Dagénan et Soludagénan) se trouve également à un taux plus élevé dans les hématies que dans le plasma. Or, il s'agit des sulfamides les plus solubles que nous ayons utilisés.

Au contraire, le sulfathiazol et le sulfafurazol (Gantrisine) pénètrent moins dans les hématies. Le fait est particulièrement marqué pour la Gantrisine dont le taux plasmatique est nettement supérieur au taux globulaire, pour la concentration réalisée.

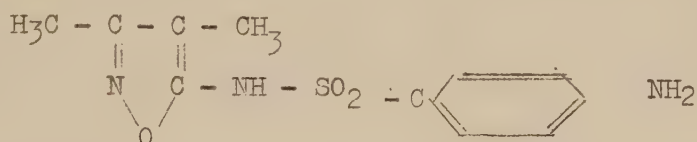
III - ETUDE CRITIQUE DE LA REPARTITION ERYTHRO-PLASMATIQUE

DU SULFAFURAZOL (GANTRISINE) DANS LE SANG.

Généralités.

Définition - Formule - Utilisations thérapeutiques:

Le sulfafurazol ou 3 - 4 diméthyl - 5 sulfanilamido - isoxazol est un dérivé de substitution hétérocyclique sur le noyau sulfamide. Il répond à la formule développée suivante:



Il représente le principe actif de la Gantrésine ROCHE, forme sous laquelle nous l'avons utilisé (sauf dans l'essai de solubilité p. 56). La préparation qui a servi à nos essais était le collyre à 4%.

Ce sulfamide est très soluble dans l'eau à la température ordinaire sous forme de sel diéthanoliné. Il peut donner ainsi des solutions parfaitement stables à pH neutre.

Sa solubilité dans les urines augmente rapidement, de 60 mg pour 100 cm³ à pH 5,4 à 327 mg à pH 6,14. Grâce à cette solubilité dans l'urine, la Gantrisine n'entraîne jamais de complications rénales (42) (99).

L'emploi de la Gantrisine est recommandé dans les maladies infectieuses; on l'utilise en particulier contre les infections urinaires à Colibacille et à B. protéus.

En nous reportant à la documentation des Etablissements ROCHE, nous avons été frappée par deux indications qui, a priori, nous semblent présenter une certaine contradiction, à savoir:

1° - La Gantrisine est un sulfamide soluble

2° - Elle n'envahit pas le protoplasma des cellules, des quantités minimes de médicament pénètrent dans les éléments figurés du sang, 93% sont retrouvés dans le plasma.

Il est connu que les sulfamides très solubles comme le sulfanilamide pénètrent facilement dans les globules rouges où leur concentration est supérieure à celle du plasma. Au contraire, des sulfamides, peu solubles, comme le sulfathiazol, pénètrent peu dans les globules rouges.

Comment se fait-il que la Gantrisine, connue comme soluble, ne pénètre pas dans les tissus et en particulier dans les hématies? Disons tout de suite que cette imperméabilité des hématies a été indiquée en particulier par MARSHALL (78) dont la méthode est universellement employée pour le dosage des sulfamides. Au contraire, plus récemment, des auteurs italiens ont montré que la concentration de la Gantrisine dans les globules rouges était notable (89).

Comme nous l'avons remarqué (page 43), la concentration globulaire du sulfafurazol (Gantrisine) est nettement inférieure à la teneur des hématies obtenue dans les mêmes conditions avec tous les autres sulfamides étudiés.

Dans certaines conditions cependant (expériences p.35), la concentration globulaire du sulfafurazol peut être supérieure à la concentration plasmatique.

En outre, si au lieu de calculer les concentrations globulaires à partir de l'analyse du sang total et du plasma, on dose directement le sulfamide dans les hématies, on constate un déficit dans le cas du sulfafurazol; déficit dépassant nettement l'approximation expérimentale (voir pages 48 et 49).

Les résultats ci-dessous illustrent cette observation:

Pourcentage de sulfamide retrouvé dans le sang total (concentration réalisée : 90 mg)

Hématocrite	Sulfafurazol (Gantrisine)	Sulfapyridine (Dagénan) (Soludagénan)		Sulfathiazol (Thiazomide)
Sang I				
Globules rouges:320	94	98,9	101	
Plasma :680				
Sang II.				
Globules rouges:280	88,1		96	98,5
Plasma :720				

Influence de l'hydrolyse sur le taux de sulfafurazol (Gantrisine)
retrouvé dans le sang.

Nous avons recherché si l'hydrolyse chlorhydrique telle qu'on la pratique dans le dosage des sulfamides totaux (sulfamide libre + sulfamide acétylé) permettrait de retrouver le sulfafurazol qui échappait au dosage habituel.

Ayant ajouté le sulfamide in vitro à des sangs, nous pensions évidemment effectuer que le dosage de la forme libre.

Voici les résultats que nous avons obtenus:

Concentration en mg. p. 1000

Concentration réalisée 100 mg. p. 1000	Plasma	Sang total
Dosage direct	105,3	81
Dosage après hydrolyse	89,9	78,3

Contrairement à notre hypothèse, l'hydrolyse n'augmente pas la quantité de sulfafurazol décelable à l'analyse.

Au contraire, nous constatons que le taux retrouvé est plus faible. Ce résultat surprenant à première vue a déjà été signalé pour d'autres sulfamides (54) et prouve qu'une partie du sulfamide est dégradé dans l'hydrolyse chlorhydrique.

Influence de l'hématocrite et de la concentration
en sulfafurazol (Gantrisine) sur le taux retrouvé
dans le sang.

Pour apprécier l'influence de l'hématocrite et de la concentration sur le taux de sulfafurazol retrouvé dans le sang, nous avons fait une expérience témoin sur le sulfanilamide et nous avons préparé simultanément des essais avec la Gantrisine.

I°) Expérience-témoin sur le sulfanilamide:

Nous avons effectué des dosages sur deux dilutions de sang:
I et II.

Concentration en mg.par litre de
sulfanilamide.

	I	II	
G.R.	: 470	G.R.	: 310
Plasma	: 530	Plasma	: 690
			Concentration réalisée au départ
Sang total	360	378	360
Plasma	187	180	
G.R.(calculé)	400	473	
Sang total	187	180	180
Plasma	158	158	
G.R.(calculé)	217	237	

Cet essai montre que le sulfanilamide est retrouvé intégralement à l'analyse du sang total. Voyons ce qu'il en est avec la Gantrisine.

2°) Expérience avec des taux variables de Gantrisine:

Nous avons effectué deux dilutions d'un même sang pour obtenir finalement les hématocrites suivants:

Globules rouges	570	380	290
Plasma	430 (1)	620 (2)	710 (3)

Nous avons dosé le sulfafurazol dans le sang total, le plasma et les globules rouges, puis nous avons calculé la concentration théorique des globules rouges d'après les taux plasmatiques (tableau page 48).

Concentration en mg par litre de Sulfafurazol (Gantrisine)

		(1) G.R.:570 Plasma:430	(2) G.R. 380 Plasma 620	(3) G.R. 290 Plasma: 710	concentration réalisée en mg par litre
A	Sang total	218	227	262	360
	Plasma	324	299	302	
	(trouvé)	207	194	216	
G.R.	(calculé)	352	459	502	
B	Sang total	96,3	115	130	180
	Plasma	196	172	211	
	(trouvé)	93	92	92	
G.R.	(calculé)	167,8	193	104	
C	Sang total	49,5	60	65	90
	Plasma	122	102	86	
	(trouvé)	36,6	36,6	42	
G.R.	(calculé)	66	70,5	100	
D	Sang total	21,3	25	28,3	45
	Plasma	64,2	50,8	45,4	
	(trouvé)	8,2	7,1	12,3	
G.R.	(calculé)	31,4	35,5	40,6	
E	Sang total	10,7	13,1	14,1	22,5
	Plasma	21,8	26,2	22,6	
	(trouvé)	4	4,6	6	
G.R.	(calculé)	23	16,5	22,4	

Pourcentage de sulfafurazol retrouvé dans l'analyse du sang total.

	(I)	(2)	(3)
A	60,55	63,05	72,77
B	53,50	63,8	72,2
C	55	66,6	72,22
D	47,33	55,5	62,9
E	47,55	58,2	62,7

Pourcentage de Sulfafurazol retrouvé dans l'analyse des Hématies.

	(I)	(2)	(3)
A	58,8	42,2	43
B	55,4	47,6	88,4
C	55,4	51,9	
D	26,1	20	30,2
E	17,3	27,8	26,7

Nous savions déjà par des analyses précédemment citées que le sulfafurazol, ajouté à un sang, ne se retrouvait pas intégralement à l'analyse.

Dans les expériences rapportées ci-dessus, nous constatons à nouveau le contraste existant entre le sulfanilamide et le sulfafurazol. Le sulfanilamide est récupéré intégralement, le sulfafurazol se retrouve à une moyenne de 50% environ.

Nous avons recherché si les quantités retrouvées dépendaient de la concentration de la solution en Gantrisine, ce qui pouvait paraître une hypothèse plausible.

Nous constatons qu'aux concentrations égales ou supérieures à 90 mg par litre (A, B, C,), le pourcentage de Gantrisine retrouvée est plus élevé (aussi bien dans l'analyse du sang total que dans l'analyse des hématies) que pour des concentrations plus faibles (D et E).

D'autre part, la quantité de globules rouges influe notablement sur la quantité de Gantrisine retrouvée aux dosages sur le sang total: celle-ci est nettement plus élevée quand il y a moins de globules rouges (le pourcentage de Gantrisine augmente de (1) à (2) et à (3).

En résumé:

La quantité de Gantrisine retrouvée à l'analyse du sang additionné in vitro de ce sulfamide est d'autant plus importante que la concentration réalisée est plus forte, et que la quantité de globules rouges est plus faible.

Influence des conditions de la défécation

I- Contrôle de la défécation employée:

Puisque la totalité du sulfafurazol ajouté à un sang n'est pas retrouvée à l'analyse, nous nous sommes demandé si la défécation classique employée était correcte.

Aucune cause d'erreur ne peut être imputée à cette manipulation: nous avons obtenu dans deux essais identiques I et II menés simultanément les résultats suivants:

Résultats exprimés en densités optiques. Vernes (D.O. x 100)

		I	II	I	II
Sulfafurazol (Gantrisine)	Sang total	17,2	17,3	16,5	16,7
	Plasma	28,5	28,4		
=====					
Sulfanilamide (Exoseptoplix)	Sang total	42,3	42,4	42,5	43,5
	Plasma	38,6	38,5		

La fidélité des résultats obtenus dans deux essais identiques menés simultanément sur le sulfafurazol et le sulfanilamide est excellente.

II- Importance de la dilution utilisée dans la défécation:

BRATTON et MARSHALL (16), FISHER et ses collaborateurs (51) ont montré que certains sulfamides peu solubles étaient entraînés dans le précipité de protéines formé lors de la défécation trichloracétique. La dilution habituelle du sang à 1/20 n'est pas suffisante dans ce cas et doit être augmentée à 1/50 et même 1/100.

Dans ces conditions, il est possible de récupérer, pas toujours, cependant, la totalité du sulfamide.

Nous avons donc essayé de doser le sulfafurazol après les dilutions du sang à :

1/25 (1) 1/50 (2) 1/100 (3)

Concentration en mg par litre
de sang trouvée.

Concentration réalisée	(1)	(2)	(3)
180	160	174	185
360	265	296	325

Aux concentrations étudiées, la défécation trichloracétique dans une dilution à 1/25 est à rejeter. La dilution à 1/100 garantit l'exactitude du résultat pour la concentration la plus faible, mais elle paraît tout en s'approchant le plus de la réalité être encore insuffisante pour une concentration plus élevée.

III- Modifications apportées par l'hémolyse:

En général, nous avons hémolysé le sang par simple dilution dans l'eau distillée. La saponine favorisant l'hémolyse (et à ce titre, elle est recommandée dans le dosage des sulfamides) nous l'avons utilisée dans quelques essais espérant ainsi améliorer le taux de sulfafurazol retrouvé dans le sang, mais les résultats obtenus étaient absolument identiques quel que soit le procédé d'hémolyse employé.

Faisant au contraire une hypothèse tout à fait différente de la nôtre, COOPER et ses collaborateurs (26)-ne pouvant retrouver la totalité d'un sulfamide peu soluble (le sulfathiazol) ajouté à un sang-avaient eu l'idée de pratiquer la défécation sans hémolyse. Le sang était dilué à 1/50 dans l'eau physiologique et les globules rouges restaient intacts. (MARSHALL, au contraire, recommandait que l'hémolyse soit totale avant la défécation).

Dans ces nouvelles conditions, les auteurs arrivaient à retrouver presque quantitativement le sulfamide peu soluble. Nous avons donc essayé cette technique et nous avons pu en effet constater que la quantité de sulfafurazol se retrouvait à un taux plus élevé lorsque les globules rouges n'étaient pas hémolysés.

Par exemple, nous avons trouvé:

310 mg pour 1.000 après dilution dans le sérum physiologique,
et seulement:

242 mg pour 1.000 après hémolyse.

Nous ne pouvons, pour le moment, expliquer ces résultats, et nous n'avons d'ailleurs découvert cette source d'erreur due à l'hémolyse qu'après de nombreux dosages effectués dans des conditions opératoires classiques, et en particulier après avoir fait l'analyse de la plupart des sangs de malades que nous rapportons ci-après.

Ce sulfamide pourrait-il être fixé par l'hémoglobine qui a diffusé?

D'après DRUEY et OESTERHELD (45), PULVER a donné cette explication pour d'autres sulfamides.

DRUEY et OESTERHELD pensent que dans le sang hémolysé, le précipité de protéines est plus fin, plus volumineux et, de ce fait, retient davantage de sulfamide.

Nous estimons, pour notre part, que le déficit tient plutôt à la libération de l'hémoglobine qui s'empare d'une partie du sulfamide en solution dans le plasma.

Etude in vivo - Analyse de sangs de malades:

Nous (1) avons analysé quelques sangs de malades traités par la Gantrisine. Le sang est recueilli sur oxalate et les dosages exécutés suivant la technique de BRATTON et MARSHALL sont appliqués, d'une part, au plasma, d'autre part, au sang total.

On déduit la concentration globulaire en tenant compte de l'hématocrite des sangs utilisés.

Les résultats obtenus ont déjà fait l'objet d'une publication (13).

Concentration en mg pour 1.000

Sulfafurazol	Sang total		Plasma		G.R. libre calculé	Hématocrites	
	libre	acétylé	libre	acétylé		G.R.	Plasma
Sang 1	40		46		26	500	700
Sang 2	52	14	170		?	180	820
Sang 3	144	16	380		?	200	800
Sang 4	47,5	9,2	73,7	13,8	?	275	725

La première analyse nous indique une concentration globulaire notable puisque les hématies ont une concentration en sulfamide moitié de celle du plasma. Au contraire, dans les trois autres sangs étudiés, la concentration globulaire est impossible à calculer. Le sulfafurazol contenu dans le plasma ne se retrouve même pas à l'analyse du sang total et les calculs nous conduisent à un taux globulaire négatif, ce qui évidemment est absurde.

Ceci nous montre qu'il n'est sûrement pas exact de déduire de la concentration plasmatique la concentration des globules rouges par analyse du sang total exécuté de cette façon, puisque le sulfamide non révélé appartient aussi au plasma. Dans ces conditions, nous ne pouvons, bien entendu, garantir l'exactitude du résultat obtenu dans notre premier essai.

Du reste, les expériences in vitro que nous avons relatées (pages 48-49) nous ont apporté la preuve de l'énorme déficit apparaissant dans l'analyse des hématies et du sang total.

(1) Nous remercions le service du Professeur GUILLEMIN qui nous a procuré ces prélèvements et Mademoiselle MARCHAL, Interne en Pharmacie, qui a bien voulu se charger de nous les faire parvenir.

Nous pouvons donc ainsi constater, d'après nos propres résultats et ceux que nous avons trouvés signalés pour des sulfamides peu solubles, le sulfathiazol en particulier, que la défécation d'un sang total dans une dilution à I/20 (celle qui est conseillée dans la pratique courante) ne convient pas lorsque le malade a été traité par un sulfamide insoluble. Au contraire, en diluant le sang à I/50 et même à I/100, on peut récupérer, pas toujours cependant, la totalité d'un sulfamide peu soluble (I6) (5I) (54).

Il est peut-être bon de souligner que l'utilisation de grandes dilutions nécessite une colorimétrie très précise. En effet, la réaction obtenue en fin de dosage du sulfafurazol est très faible et pour une prise d'essai équivalente à celle du sulfanilamide, par exemple, beaucoup moins intense (Graphique page 28).

Pour pallier à la cause d'erreur due à l'hémolyse des globules rouges (page 53), nous avons déféqué le sang 4 après dilution dans l'eau physiologique au lieu d'eau distillée.

Nous trouvons effectivement un résultat supérieur:

56,5 mg p. 1000 au lieu de 47,5 mg.

Si, par curiosité, nous essayons, à l'aide de cette valeur, de calculer le taux éventuel de sulfafurazol dans les hématies, nous trouvons, à la place d'un résultat négatif, 3 mg par litre. Nous ne devons évidemment attribuer qu'une valeur relative à ce résultat.

Nous remarquons dans nos essais le faible pourcentage de sulfafurazol acétylé. Ce fait est d'ailleurs connu (78).

Tous les autres sulfamides subissent, au contraire, dans l'organisme, une acétylation marquée en rapport avec leur toxicité en général.

Nous indiquerons ici, comme exemple personnel, les résultats obtenus dans l'analyse d'un sang de malade intoxiqué par une forte dose de Solumédine (sulfamérazine).

Concentration en mg pour 1.000

Sulfa- mérazine	Sang total		Plasma		Globules rouges		Hématocrite	
	libre	acétylée	libre	acétylée	libre	acétylée	G.R.	plasma
	I50	250	200	300	I50	50	330	670

Le volume d'urine émis en 24 heures par ce malade était de 550 cm³. Il est intéressant d'indiquer ici comparativement au sang sa concentration en sulfamide.

Sulfamide libre	:	375 mg pour 1.000
" acétylé	:	1125 mg " "
Rapport S libre	:	0,33
S acétylé		

Ce rapport confirmait les signes d'intoxication présentés par ce malade; la normale étant comprise entre 3 et 4.

Nous remarquerons, de plus, le chiffre élevé du sulfamide acétylé dans le plasma où comme dans l'urine, il se trouve à un taux supérieur à celui de la forme libre.

Solubilités comparées du sulfathiazol et du sulfafurazol.

Dans notre étude de répartition érythro-plasmatique in vitro et in vivo du sulfafurazol, nous avons eu l'occasion de rapporter à plusieurs reprises la ressemblance qui existait entre ce sulfamide et le sulfathiazol, sulfamide peu soluble.

Nous avons donc pensé que le qualificatif de "sulfamide soluble" attribué au sulfafurazol avait trait à sa solubilité en milieu biologique.

Les recherches de SVEC et de ses collaborateurs (IIO) ont mis, en effet, en évidence, une grande solubilité du produit dans l'urine.

Nous avons, alors, comparé les solubilités du sulfathiazol et du sulfafurazol, principe actif de la Gantrisine, d'une part, en solution aqueuse, d'autre part, en milieu urinaire à des pH très voisins. La durée de contact en milieu aqueux a été de douze heures. Nous avons réalisé l'essai sur l'urine après quinze minutes de contact.

Sulfamide dissous en mg pour I.000

Sulfamide ajouté I.000 mg	Sulfafurazol	Sulfathiazol
En solution aqueuse (pH = 5)	103	294
En milieu urinaire (pH = 5,75)	951	405

Nous voyons que la solubilité du sulfafurazol en solution aqueuse est très faible, mais qu'elle est considérablement augmentée en milieu urinaire.

Au contraire, la solubilité du sulfathiazol, sulfamide peu soluble est plus élevée que celle du sulfafurazol en solution aqueuse, mais elle n'atteint pas 50% de la solubilité urinaire du sulfafurazol au même pH.

Répartition comparée dans les tissus - Etude in vitro

La fixation des médicaments dans les hématies étant souvent l'image de la fixation dans les tissus, nous avons cherché à la suite de notre longue étude sur le sang si les sulfamides manifestaient une certaine affinité pour divers tissus.

Nous avons, dans ce but, mis en contact deux solutions de sulfamides, le sulfanilamide et le sulfafurazol (Gantrisine) avec des fragments d'organes, prélevés sur différents animaux, puis nous avons dosé le sulfamide dans la solution après contact de 1 heure et 5 heures (I et II)

La technique de dosage suivie sera identique à celle utilisée pour le sang.

Si les tissus s'imprègnent de la solution en fixant le médicament, la concentration des solutions doit diminuer.

Dans le cas contraire, elle ne doit pas varier et doit donc rester égale à 100 mg par litre (concentration initiale).

Concentration en mg par litre de la solution.

Tissus mis en contact RAT	Sulfanilamide (Exoseptoplix)		Sulfafurazol (Gantrisine)	
	I	II	I	II
Rein	82	92	80,5	84
Foie	90	82	84	90
Poumon	95	93	85	85
Muscle	86	78	83	90
=====				
COBAYE				
Rein	72		92	98
Foie	76	80	83	87
Poumon	80	72	76	80
Muscle	77	75	74	79

Il nous est difficile d'interpréter les résultats de ces analyses. La trop faible diminution de concentration observée dans la solution (dans la marge d'approximation du dosage) ne nous permet pas de considérer qu'il y a eu rétention du sulfamide dans les tissus dans les deux exemples choisis et quel que soit le sulfamide.

D'ailleurs, les résultats sont indépendants de la durée de contact.

Nous verrons ultérieurement, à propos de la Chlorpromazine, combien manifeste peut être l'affinité d'un tissu.

Essais de dialyse - Le sulfafurazol (Gantrisine) est-il lié aux
protéines plasmatiques?

Comme l'ont montré nos résultats, la Gantrisine pénètre en général beaucoup moins dans les hématies que les autres sulfamides. Par ailleurs, LANGE MANN (76) a constaté que le sulfafurazol passait difficilement dans le liquide céphalo-rachidien: pour des concentrations de sérum de 10 mg %, elle n'est pas décelable dans le liquide céphalo-rachidien et SARTOFF (d'après LANGE MANN) évalue au plus à 10% le sulfafurazol dialysable dans le L.C.R. Ceci nous a conduit à penser que le sulfafurazol était susceptible de se lier en grande partie aux protéines plasmatiques, en accord sur ce point avec RANDALL et coll (92).

Nous avons donc essayé de confirmer notre hypothèse en réalisant des dialyses comparées sur ce sulfamide et sur le sulfanilamide. Nous avons utilisé comme membrane semi-perméable des sacs de collodion que nous préparions nous-même ou de la cellophane.

Nous devons reconnaître que la semi-perméabilité de nos membranes n'était pas parfaite et laissait passer des protéines. Cependant, menant concurremment nos essais sur deux sulfamides, nous estimons que nos expériences donnent des résultats comparatifs valables.

Si une différence apparaît entre la dialyse du sulfanilamide connu pour être très peu lié ou pas lié aux protéines et la dialyse du sulfafurazol que nous présumons fortement lié, elle n'en sera que plus significative (les protéines filtrées ayant pu entraîner dans le dialysat une certaine quantité de sulfamide lié que nous interpréterions comme sulfamide non lié (14)).

1°) Expérience en sac de collodion

: Nous avons mesuré dans des sacs de collodion 10 cm³ de plasma contenant 1 mg du sulfamide étudié. Dans l'expérience que nous relatons, la dialyse s'est faite à température ordinaire contre 200 cm³ d'eau physiologique.

Dans un premier essai, la dialyse a duré 5 heures; dans le second, elle s'est prolongée pendant 13 heures.

Nous avons dosé en fin d'expérience:

- les protéines totales dans le plasma contenu dans le sac par la méthode de F. KAYSER.

- Les sulfamides passés dans le dialysat.

N° I

Taux de sulfamide en mg.

Au départ: 1 mg dans 10 cm ³ de plasma	Sulfanilamide	Sulfafurazol
Sulfamide dans le sac	Traces	0,23
Sulfamide dans le dialysat	0,98	0,70

Cette première expérience montre qu'après une dialyse de 13 heures, 70 % du sulfafurazol a quitté le plasma; le sulfanilamide ayant pratiquement totalement disparu du plasma après ce même temps.

N° 2:

Au départ: 1 mg de sulfamide dans 10 cm ³ de plasma Protéines totales du plasma: 71,20 g par litre		
Après 5 heures:	Sulfanilamide	Sulfafurazol
Protéines restant dans le sac	65,32 g	68,30 g
Sulfamides du dialysat	0,85 mg	0,675 mg
Après 13 heures:		
Protéines restant dans le sac	62,18 g	56,88 g
Sulfamides du dialysat	0,95 mg	0,50 mg

Cette seconde expérience confirme la dialyse moins importante du sulfafurazol comparée à celle du sulfanilamide.

2°) Expérience en sac de cellophane

Le mode opératoire suivi est le même que dans le cas précédent, mais la dialyse est effectuée parallèlement sur solution de sulfamide dans l'eau physiologique et sur solution dans le plasma.

Au départ: 1 mg de sulfamide dans 10 cm ³ de solution 0,9 mg " " " " de plasma. Protéines totales du plasma: 64,80 g. par litre.				
Après 13 heures:	Sulfanilamide		Sulfafurazol	
Protéines restant dans le sac	Eau physiologique.	Plasma	Eau physiologique	Plasma
		51,60 g		53 g
Sulfamides du dialysat	0,89 mg	0,88mg	0,90 mg	0,28 mg

L'expérience en sac de cellophane montre une dialyse identique du sulfanilamide dans l'eau physiologique et en milieu plasmatique.

Pour le sulfafurazol, la dialyse en milieu eau physiologique est identique à celle du sulfanilamide; au contraire, en milieu plasmatique, elle est énormément réduite.

Les résultats figurant ci-dessus sont en faveur d'une combinaison protéique du sulfafurazol.

En résumé:

Nos expériences sur le sulfafurazol (sous forme de Gantrisine) montrent que le dosage de ce sulfamide présente des difficultés.

La grande solubilité du sulfafurazol en milieu biologique le distingue de sulfamides peu solubles dont il se rapproche cependant à certains points de vue.

Les résultats obtenus dans des dialyses de plasma contenant de la Gantrisine laissent à penser que le sulfafurazol contracte une liaison protéique.

- D E U X I E M E P A R T I E -
=====

Etude de

- CHLORPROMAZINE

- DIETHAZINE et MEPYRAMINE.

Nous allons à présent envisager dans une deuxième Partie une étude bien différente de celle des Sulfamides.

Il s'agit, d'abord, d'un médicament récent : la Chlorpromazine sur lequel nous n'avons pas trouvé un travail d'ensemble chimique. Nous avons donc exploré, en quelque sorte, un monde un peu inconnu et fermé qui s'est révélé pour nous particulièrement intéressant.

Ensuite, nous étudierons un autre dérivé de la phénothiazine: la Diéthazine ou Diparcol.

Nous en rapprocherons un médicament dont les propriétés pharmacologiques sont voisines: la Mépyramine ou Néo-Antergan.

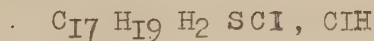
- GENERALITES -

Chlorpromazine ou Largactil

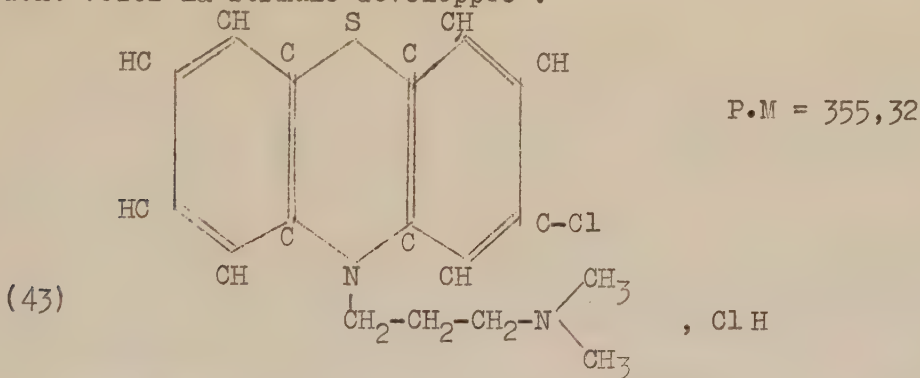
Définition - Formule - Utilisations thérapeutiques.

La chlorpromazine appelée ainsi par la Commission du Codex français est connue également sous le nom de Largactil.

Ce nom, déposé par la firme SPECIA, caractérise le 4560 R P ou chlorhydrate de chloro 3 (diméthylamino 3' propyl) 10 phénothiazine.



dont voici la formule développée :



Ce dérivé aminé de la phénothiazine aux propriétés pharmacodynamiques multiples (sympathicolytique - vagolytique - spasmolytique - sédatif) possède en outre la possibilité d'augmenter la réceptivité de l'organisme vis-à-vis des agents neuro-dépresseurs, tout en conservant celle de restaurer l'équilibre de tonus nerveux perturbés.

Cette dernière propriété est bien spécifique de ce corps et lui a valu l'attribution d'un qualificatif nouveau et original: celui de neuroplégique.

La chlorpromazine apparaît donc comme douée d'activités expérimentales variées parmi lesquelles celles qui ont trait au système autonome, périphérique et central sont particulièrement importantes.

Cette multiplicité d'activité lui confère des applications thérapeutiques nombreuses et variées intéressant aussi bien le domaine chirurgical que médical et obstétrical.

Ses principales indications sont:

- Dans le domaine chirurgical: préparation à l'anesthésie, anesthésie potentialisée.
Hibernation artificielle, traitement des hyperthermies post-opératoires.
Hypotension contrôlée.
- Dans le domaine médical : excitation maniaque, psychoses, syndromes confusionnels
Névralgies, spasmalgies.
Tétanos (en liaison avec les traitements classiques)
Vomissements d'origine centrale.
- Dans le domaine obstétrical: analgésie obstétricale.
Vomissements incoercibles.
Eclampsie.

si bien que la chlorpromazine est actuellement un des médicaments les plus employés. D'ailleurs, la pharmacodynamie de la chlorpromazine a suscité de nombreuses recherches et un important travail d'ensemble de Mme COURVOISIER et collaborateurs (28), complété par les expériences de BURN (21).

Circulation dans l'organisme:

Le passage de la chlorpromazine dans le milieu sanguin et son élimination par l'arbre urinaire ont été étudiés particulièrement chez le lapin et ont amené à penser que le médicament subissait une profonde dégradation dans l'organisme puisque le pourcentage total éliminé en trois jours par les reins ne représente que 7 à 8 % de la quantité ingérée.

On ignore le sort de la chlorpromazine et ses formes d'élimination. Les travaux de BENNHAI ont seulement mis en évidence l'existence de dérivés conjugués dans l'urine de lapin, quand la phénothiazine est administrée à l'animal (5).

C'est la rapide disparition du sang de la chlorpromazine qui a orienté nos recherches.

Réactions de caractérisation de la chlorpromazine:

La chlorpromazine et les dérivés de la phénothiazine ont pu être identifiés et différencés:

- par des réactions de précipitation et de cristallisation (picrate-chloroaurate, chloroplatinate)
- par des réactifs de coloration des alcaloïdes (réactifs de Mandelin, de Froede, de Marquis),
- ou par des réactions d'oxydation que nous allons envisager à propos du dosage.

II - TECHNIQUE DU DOSAGE DE LA CHLORPROMAZINE

La réaction colorée:

Le dosage de la chlorpromazine est basé sur une réaction d'oxydation. De nombreux réactifs d'oxydation peuvent être utilisés:

Chlorure de palladium et eau de brome - hypobromite de soude - perchlorure de fer ou persulfate de sodium.

BRIGNON (17)(18), utilise l'acide sulfurique bromé.

BERTI et CIMA (8) (9) ont combiné l'action de HCl et de NO_2Na à une faible concentration.

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé la méthode de dosage de P. DUBOST et S. PASCAL basée sur une oxydation du produit en milieu sulfurique concentré (47).

Etude de la coloration- sa comparaison à un témoin minéral.

Nous avons rapproché de la coloration carminée obtenue par la chlorpromazine en milieu aqueux (soluté isotonique de chlorure de sodium à 9 pour 1.000 ou eau distillée) celle d'une solution de nitrate de cobalt (solution à 3% dans l'alcool absolu).

Ce témoin minéral déterminé présente l'avantage de rester stable et toujours semblable à lui-même.

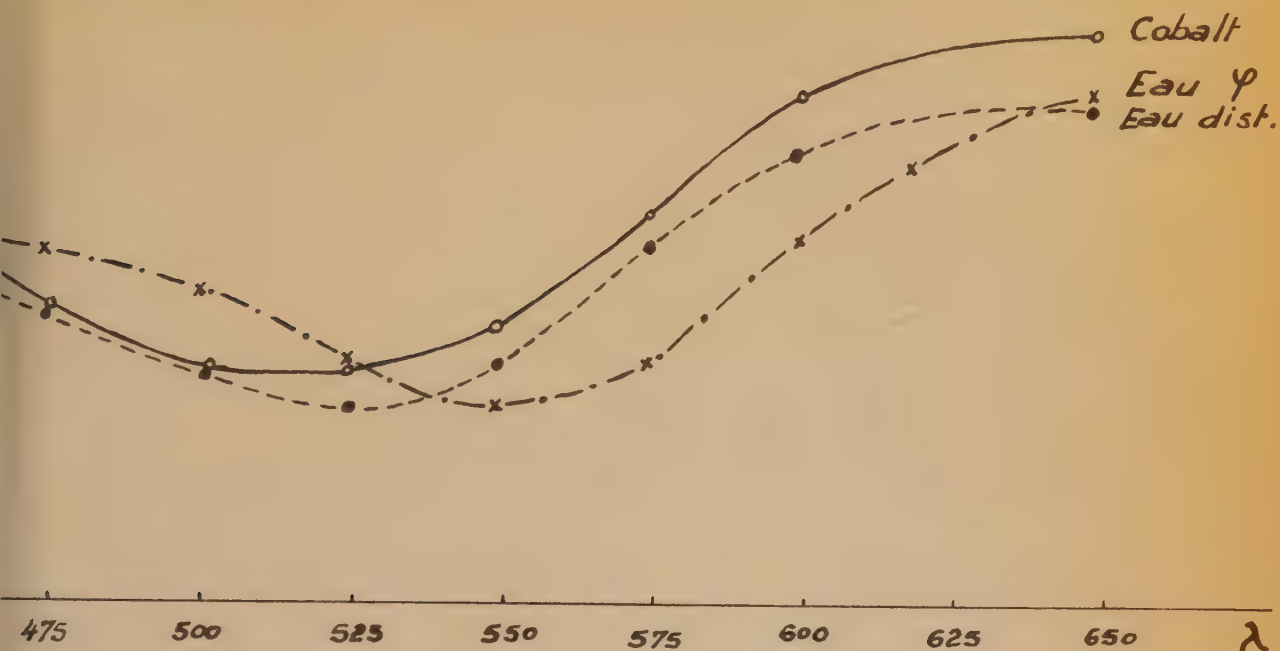
Nous avons réalisé des concentrations différentes de chlorpromazine et de nitrate de cobalt et nous avons utilisé le spectrophotomètre de COLEMAN pour comparer les courbes de transmission en fonction de la longueur d'onde.

Nous avons obtenu parfois, par oxydation de la chlorpromazine, au lieu de la coloration rose, une teinte violette, particulièrement avec le soluté isotonique de ClNa.

Nous avons fait figurer dans le graphique ci-après:

- en trait plein, le pourcentage de transmission de la solution de nitrate de cobalt (courbe désignée par l'abréviation "Cobalt")
- en traits interrompus, le pourcentage de transmission de la réaction colorée rose obtenue avec une solution de chlorpromazine dans l'eau distillée (courbe désignée par l'abréviation "eau dist.").
- en traits-croix-points, le pourcentage de transmission de la réaction colorée violette obtenue dans le cas présent avec une solution de chlorpromazine dans le soluté de ClNa (d'où la désignation abrégée "eau φ ").

Réaction colorée de la CHLORPROMAZINE



Ce graphique montre que les colorations dues, l'une au nitrate de Cobalt, l'autre à l'oxydation de la chlorpromazine sont très semblables.

Lorsque la coloration obtenue est violette, le minimum de transmission est légèrement déplacé (de 525 à 550 mμ)

A la longueur d'onde 525 mμ, on obtient une bonne concordance entre les densités optiques observées et les quantités de nitrate de cobalt et de chlorpromazine correspondantes.

En effet, en choisissant pour chacune des solutions roses, deux densités optiques voisines, on obtient par exemple:

Solution	Quantités	Densité optique x 100 D.O.	Rapport des concentrations x 1.000	Rapport des colorations (des D.O.)
Chlorpromazine	0,05 mg	31,5	1,128	1,126
Nitrate de Cobalt	44,3 mg	35,5		
Chlorpromazine	0,1 mg	53,5	1,22	1,09
Nitrate de Cobalt	81,9 mg	49		

Etude de la coloration - ses variations:

Nous avons signalé plus haut la coloration violette qui est obtenue parfois dans l'oxydation de la chlorpromazine par SO_4H_2 .

Cette teinte violette est moins stable que la coloration rose.

Si nous soumettons une solution de chlorpromazine qui donne avec SO_4H_2 pur une coloration violette au processus d'analyse complet, la coloration finale obtenue avec SO_4H_2 est rose.

- La coloration rose obtenue avec SO_4H_2 pur traduit une altération profonde de la chlorpromazine; il n'est pas possible, en effet, d'identifier à nouveau la chlorpromazine après une telle réaction.

Nous neutralisons cette solution colorée par de la soude, il se produit une décoloration.

Cette solution incolore soumise à une extraction normale et complète ne produit plus de coloration rose en présence d'acide sulfurique: la molécule de chlorpromazine a donc été modifiée de façon irréversible par l'oxydation sulfurique.

- La solution finale de chlorpromazine dans SO_4H_2 0,1 N se colore à la longue en rose pâle; la lumière solaire jouant vraisemblablement un rôle d'oxydant doux qui est remplacé dans la réaction par un oxydant beaucoup plus fort: SO_4H_2 pur.

Il est important de noter que l'échantillon d'acide sulfurique pur utilisé semble intervenir dans l'intensité de la coloration obtenue avec la chlorpromazine. Ceci se produit également avec la diéthazine et la mépyramine.

D'ailleurs DUBOST a été amené à recommander l'emploi de certaines substances pour stabiliser la coloration. L'acide sulfurique R.P. de $d = 1,83$ est remplacé par l'acide sulfurique alcoolisé ou formolé à 2 % dont la préparation extemporanée est préférable (48).

Son application au dosage en milieu biologique:

Plusieurs méthodes de dosage ont pu être appliquées.

- BRIGNON (17) précipite les protéines du sérum par 10 volumes d'alcool acétone à parties égales, puis pratique une extraction à chaud par ce solvant.

Le précipité de protéine est extrait une deuxième fois par l'alcool à 95°.

Les liqueurs extractives sont rassemblées puis évaporées au bain marie bouillant. Le résidu est alors repris par SO_4H_2 0,1 N. On lave à l'éther. La liqueur étherée surnageante dissout les lipides et impuretés. Sur la solution aqueuse sous-jacente incolore, on dose colorimétriquement la chlorpromazine.

- BERTI et CIMA (8) (9) précipitent, eux aussi, les protéines des tissus en présence d'un mélange alcool éthylique - acétone (5 parties en volume pour une partie d'organe pesé). Après un contact de 15', le précipité est lavé à deux reprises avec un mélange d'alcool-acétone. On évapore au bain-marie et on reprend le résidu par HCl 0,1 N. On lave cet acide par l'éther et après agitation, on fait la réaction colorée sur la solution aqueuse purifiée.

- En ce qui nous concerne, nous suivrons la méthode de dosage décrite par DUBOST et PASCAL (47)

On extrait la base par l'éther en milieu alcalin, puis on reforme un sel acide qui, en présence, d'acide sulfurique concentré à 66°B donne une coloration carminée susceptible de dosage. Voici d'ailleurs la technique décrite dans les détails.

Dosage par la méthode de DUBOST et PASCAL:

5 cm³ de sang reçus sur oxalate (ou dans nos expériences, solutions de chlorpromazine ou tissus) sont chauffés 3 minutes au bain marie bouillant avec 5 cm³ de potasse à 60%. On prendra soin d'agiter le mélange pendant la dernière minute.

Le liquide refroidi est dilué à 20 cm³ avec de l'eau distillée. On pratique ensuite 3 épuisements à l'éther en agitant chaque fois 5 minutes avec 20 cm³ d'éther et on laisse décanter. Le mélange des éthers séparés est lavé par agitation deux fois avec 10 cm³ de soude 0,2 N et une fois avec 10 cm³ d'eau distillée.

L'éther après lavage est agité fortement avec 6 cm³ SO_4H_2 0,1 N. La liqueur acide séparée par décantation est débarrassée des traces d'éther par le vide (le liquide est placé dans un bécher de 50 cm³ et dans un exsiccateur où l'on fait le vide avec précaution).

A 2,5 cm³ de cette liqueur acide on ajoute 2,5 cm³ SO_4H_2 pur (d = 1,83).

On mélange et on obtient en présence de chlorpromazine une coloration rouge carminée que l'on dose à l'électrophotomètre Neunier (écran 55).

Pour notre part, nous avons utilisé le photocolorimètre de Bonet Maury et nous avons lu la coloration à l'écran vert n° 3, de longueur d'onde 520 à 570 mμ.

Pour nous placer dans les conditions exactes du dosage, nous comparerons chaque fois la coloration obtenue à celle d'une solution étalon de chlorpromazine. Le témoin sera la solution même qui a servi à préparer nos essais dans les expériences in vitro.

Nous avons opéré de cette manière pour pallier à l'intervention de certains facteurs extérieurs qui nous échappent, il faut bien l'avouer, et ne permettent pas de doser la chlorpromazine avec toute la fidélité souhaitable. On ne peut donc se reporter à un graphique préétabli.

Cette méthode de dosage permet de retrouver jusqu'à 25 mg de chlorpromazine par litre.

Notes sur le protocole d'analyse:

- Le dosage de la chlorpromazine totale doit se faire après hydrolyse acide. On dose en effet le produit total qui représente la somme: Chl.libre + Chl.conjugée.

L'hydrolyse potassique ne permettrait de doser que la forme libre.

Mais en pratiquant l'hydrolyse acide sur des sangs additionnés de chlorpromazine ou sur des prélèvements in situ, nous n'avons pu obtenir de résultats fidèles et surtout les résultats étaient inférieurs à ceux fournis après traitement à la potasse. Ceci est visiblement faux (puisque'il s'agit de chlorpromazine libre dans le premier cas et de chlorpromazine totale dans le second).

Nous avons donc pratiqué dans toutes nos expériences l'hydrolyse alcaline qui nous permet de retrouver la chlorpromazine ajoutée à un échantillon biologique, dans les limites de la précision de la méthode évidemment - limite de l'ordre de 10 %.

Nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas destruction du produit au cours de l'hydrolyse.

En fait, HCl donne bien une légère coloration rose, mais celle-ci disparaît lors de la neutralisation ultérieure et sur une solution titrée de chlorpromazine l'hydrolyse chlorhydrique donne des résultats identiques à l'hydrolyse potassique.

- Nous avons essayé de faire une défécation trichloracétique du sang total et d'opérer sur ce filtrat pour y doser in vitro la chlorpromazine totale.

On termine le dosage comme précédemment, mais on n'obtient pas de coloration rose en présence de SO_4H_2 pur.

Donc, la chlorpromazine semble être retenue dans le précipité de protéines. L'acide trichloracétique ne convient pas comme solvant des dérivés de la phénothiazine.

- Extraction et coloration doivent être menées sans interruption dans leur exécution. En effet, nous avons déjà signalé, d'une part, que la solution finale sulfurique de chlorpromazine prenait une légère teinte rose, d'autre part que, même si aucune coloration n'apparaissait, la réaction pratiquée sur une telle solution extractive datant de quelques heures donne une teinte violette et non rose.

Nous avons constaté une perte de chlorpromazine égale à 50% dans le cas où l'extraction se faisait 48 heures après l'hydrolyse potassique:

deux essais commencés ensemble et terminés à 48 heures d'intervalle donnent 0,187 mg pour le premier, contre 0,0956 pour le second.

III - REPARTITION DE LA CHLORPROMAZINE DANS LE SANG - ETUDE IN VITRO

La rapide disparition de la chlorpromazine du sang nous a incitée à rechercher si ce produit ne se fixait pas dans certains tissus et peut-être d'une manière élective.

A notre connaissance, aucun travail n'a paru sur la répartition érythro-plasmatique de la chlorpromazine. C'est pourquoi, étant donné l'intérêt de cette répartition et la similitude fréquente de fixation sur les tissus et sur les hématies en circulation, nous avons étudié la rétention de la chlorpromazine dans l'organisme sous ces deux aspects.

Cette fixation du médicament, nous l'avons suivie en fonction du temps et du mode d'agitation.

Une quantité de sang variant de 5 cm³ à 50 cm³ est additionnée du 1/10 de son volume de solution de chlorpromazine (Largactil) et l'ensemble est laissé à la température ordinaire. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps différents. Dans certains essais, une agitation soit régulière à la main soit mécanique est réalisée pendant la durée de l'expérience.

Des nombreux essais réalisés, il ressort que la durée de contact n'influe pas sur la fixation de la chlorpromazine. Il apparaît que le produit se répartit in vitro d'une manière immédiate et le taux de produit retrouvé après des temps de contact variant de 2 à 8 heures est sensiblement le même. Le médicament ne subit pas d'altérations dans les conditions réalisées.

D'autre part, l'agitation, qu'elle soit faite d'une manière mécanique régulière ou à la main à des intervalles de temps plus ou moins espacés ne modifie pas cette répartition.

Dans une première publication (II), opérant sur du sang humain (datant d'au moins 24 h.) et sur du sang de boeuf, recueillis sur anticoagulants, nous remarquons que, compte tenu de l'hématocrite des différents sangs examinés, la chlorpromazine se répartissait d'une manière sensiblement égale entre le plasma et les globules.

Nous avons, depuis, fait de nouvelles expériences en nous servant de matériel biologique homogène que nous n'avions pu nous procurer auparavant, à savoir du sang humain destiné à la transfusion, et les résultats se sont montrés différents.

Protocole d'analyse:

=====

I - Expériences sur sangs humains.

50 cm³ de sang total (sang de transfusion recueilli sur anti-coagulant) sont additionnés de 5 cm³ de solution de chlorpromazine à 1 pour 1.000.

La dilution de chlorpromazine a été réalisée comme suit:

Une ampoule de 2 cm³ de Largactil pour injection intraveineuse (contenant 50 mg de Largactil) a été diluée à 50 cm³ avec du chlorure de sodium en solution isotonique.

La concentration finale réalisée, si la répartition était homogène et égale entre les hématies et le plasma, serait de 90 mg pour 1.000, soit 0,09 mg par cm³.

2 prélèvements de 10 cm³ sont effectués:

- l'un au temps 0 (temps nécessaire à l'agitation et à la centrifugation)
- l'autre après 2 heures.

On a pratiqué dans cet intervalle de 2 heures une agitation toutes les 15 minutes.

On centrifuge et on prélève 5 cm³ de plasma. On ajoute 5 cm³ de solution de potasse à 60%.

Le mode opératoire suivi, alors, a été décrit antérieurement.

On opère de même sur 5 cm³ de sang total.

Dans ces conditions, nous avons observé de façon constante une répartition inégale du médicament entre le plasma et les hématies.

Voici dans le détail un de nos essais:

L'hématocrite du sang étudié est:

Globules rouges : 320 cm³
Plasma : 680 cm³

- Dosage dans le plasma:

T = 0 En comparant à une solution témoin, nous trouvons que
2,5 cm³ de liqueur finale renferment 0,0837 mg
1 cm³ de plasma renferme:

$$\frac{0,837 \times 6}{2,5 \times 5} = 0,04 \text{ mg}$$

Dans 6,8 cm³ il y a donc:

$$0,04 \times 6,8 = 0,272 \text{ mg}$$

T = 2 h. En comparant à une solution témoin, nous trouvons que:

2,5 cm³ de liqueur finale renferment 0,098 mg

1 cm³ de plasma renferme:

$$\frac{0,098 \times 6}{2,5 \times 5} = 0,047 \text{ mg.}$$

Dans 6,8 cm³, il y a donc:

$$0,047 \times 6,8 = 0,320 \text{ mg.}$$

- Dosage dans le sang total:

T = 2 h. En comparant à une solution témoin, nous trouvons que:

1 cm³ de liqueur finale renferme 0,0765 mg

1 cm³ de sang renferme:

$$\frac{0,0765 \times 6}{2,5 \times 5} = 0,092 \text{ mg}$$

Après 2 heures, dans 10 cm³ de sang total, on trouve:

$$0,092 \times 10 = 0,92 \text{ mg.}$$

Il revient au plasma 0,32 mg

Il reste pour 3,2 cm³ de G.R= 0,60 mg

soit: $\frac{0,60}{3,2} = 0,187 \text{ mg par cm}^3$

Après 2 heures, nous retrouvons ainsi dans 10 cm³ de sang, 0,92 au lieu de 0,90 mg mis pratiquement.

La chlorpromazine est donc dosée en totalité.

La concentration des globules rouges est quatre fois plus élevée que celle du plasma.

Un deuxième essai, mené dans des conditions absolument semblables nous a encore montré une répartition érythro-plasmatique fort inégale :

Résultats: Voici, rassemblés, les résultats de ces 2 essais:

Essai n° I:

Concentration de chlorpromazine réalisé:	90 mg par litre de sang
Hématocrite du sang étudié: Globules rouges	320 cm ³
Plasma	680 cm ³
Temps 0 : concentration plasmatique	40 mg
Temps 2 h.: concentration plasmatique	47 mg
concentration globulaire	187 mg
Il est retrouvé en chlorpromazine dans le sang total	92 mg

Essai n° 2:

Concentration de chlorpromazine réalisée:	90 mg par litre de sang
Hématocrite du sang étudié: Globules rouges	280 cm ³
Plasma	720 cm ³
Temps 0 : concentration plasmatique	35 mg
concentration globulaire	108 mg
Temps 2 h.: concentration plasmatique	36 mg 4

Ces deux expériences, comme tous nos autres essais, confirment que la répartition de la chlorpromazine entre le plasma et les globules est instantanée et nous montrent que ce produit se retrouve à un taux beaucoup moins concentré dans le plasma que dans les globules rouges.

2 - Expérience sur sang de cobaye.

Nous avons également opéré sur du sang frais de cobaye. Cet animal a été sacrifié par saignée et nous avons réalisé parallèlement des essais in vitro avec ses tissus (Cf. page 79).

5 cm³ de sang total ont été additionnés de 5 cm³ d'une solution de chlorpromazine.

5 cm³ de solution de Largactil à 0,1g pour I.000
+ 0,5 cm³ d'eau physiologique.

L'hématocrite du sang dilué par la solution de Largactil était égale à :

Globules rouges : 200 cm³
Plasma : 800 cm³

Calculs:

Au départ: $\frac{0,5 \times 5}{5,5} = 0,45 \text{ mg}$

Concentration en chlorpromazine p. I.000:

Plasma: $\frac{0,07 \times 6 \times \text{I.000}}{2,5 \times 6,7} = 0,025 \text{ g}$

Globules rouges: $\frac{0,1 \times 6 \times \text{I.000}}{2,5 \times 1,65} = 0,14 \text{ g}$

Concentrations respectives du plasma et des Globules rouges de 10cm³ de sang:

Plasma 0,025 X 8 = 0,20 mg

Globules rouges: 0,14 X 2 = 0,28 mg

. Au total : 0,48 mg

Le résultat final est de 0,48 mg dans 10 cm³ de sang au lieu de 0,45 mg au départ. Ici encore, toute la chlorpromazine ajoutée au sang est retrouvée.

Les résultats obtenus dans ces dosages montrent que la chlorpromazine se retrouve à un taux beaucoup moins concentré dans le plasma que dans les globules rouges.

Avant d'envisager la répartition de la chlorpromazine dans les tissus, nous avons encore recherché, du fait de la rapide disparition de la chlorpromazine du sang, l'existence éventuelle d'un enzyme qui détruirait ce médicament.

Nous avons opéré sur du sang de lapin recueilli sur oxalate: 5 cm³ de sang frais sont mis en contact avec 20 cm³ de solution de chlorpromazine (Largactil) à 0,1 g p. 1.000.

Nous faisons un dosage immédiatement, puis après 2h.30. Il ne s'est produit aucune variation dans les résultats trouvés, donc on ne peut conclure à l'existence d'un enzyme qui dégraderait la molécule de chlorpromazine.

IV - REPARTITION DE LA CHLORPROMAZINE DANS LES TISSUS - ETUDE IN VITRO

Une expérience sur un chien chloralosé nous a montré l'absence totale de chlorpromazine dans le sang sur des échantillons prélevés 1/2 h., 3 h. et 6 h. après injection intra-veineuse de 100 mg, mais le cerveau, le foie et l'intestin prélevés à ce dernier temps montraient une réaction nettement positive.

D'autre part, il est fait état dans plusieurs publications (35) (73) (77), de la confusion possible de la chlorpromazine et de la strychnine lors de la recherche de cet alcaloïde en toxicologie. Ceci est donc une preuve de la rétention de la chlorpromazine par les tissus chez l'animal vivant.

Nous nous sommes demandé si, in vitro, les tissus étaient également capables de retenir aussi ce médicament.

Protocole d'analyse:

Nous avons donc mis en contact divers tissus avec une solution de chlorpromazine (dans l'eau physiologique ou dans le liquide de Tyrode). Ces tissus ont été prélevés sur animal saigné ou sur animal anesthésié, au préalable.

Nous les avons tantôt réduits en bouillie, tantôt découpés en minces fragments.

Nous allons, dans ces essais in vitro, doser la chlorpromazine, d'une part, dans la solution surnageante, d'autre part, dans les tissus. Nous adopterons dans les deux cas la technique de DUBOST et PASCAL (47).

1) la solution surnageante:

Tant que de la matière organique du tissu n'est pas entrée en solution ou en suspension, il est possible de faire la réaction colorée directement sur la solution (pratiquement pendant la première demi-heure de contact et même jusqu'à deux heures).

Mais dès qu'il y a présence de matière organique, la réaction directe n'est plus possible, la coloration rose devenant très rapidement sinon instantanément jaune. A partir de ce moment, il faut soumettre la solution à l'extraction méthodique.

2) les tissus:

Ils sont analysés en fin d'expérience après un temps de contact bien déterminé. La solution est séparée par décantation après centrifugation du tout.

Ensuite, les tissus sont lavés une fois par de l'eau et additionnés dans le tube même de solution potassique avant d'être portés au bain marie bouillant.

Résultats:

1 - Tissus de lapin:

On met en contact 5 g. de tissu découpé en minces fragments avec 40 cm³ de solution de chlorpromazine à 0,1 g p.I.000

Si la répartition était homogène entre le tissu et la solution, c'est-à-dire s'il y avait simple imbibition du tissu par la solution médicamenteuse, on devrait retrouver 0,1 mg par cm³ dans la solution.

En fait, on a constaté une diminution rapide du taux de chlorpromazine de la solution et ceci déjà après trente minutes.

Les résultats obtenus figurent p. 78 .

II- Tissus de chat (11)

Un deuxième exemple sera constitué par les tissus d'un chat chlorallosé.

Nous mettons en suspension dans 50 cm³ de solution de chlorpromazine à 0,1 g. p.I.000, 10 g. des tissus suivants: foie, cerveau, rein, intestin, muscle (prélevé à la patte).

Le processus suivi a été le même que dans le cas précédent.

Les résultats sont inscrits p.78 .

III- Tissus de cobaye:

Le cobaye a été sacrifié par saignée.

Nous avons antérieurement (p.74), analysé le sang provenant de la c. carotide, recueilli sur oxalate et qui avait été mis en contact pendant 6 h.30 avec une solution de chlorpromazine.

Nous avons prélevé chez ce cobaye un poids variable suivant la quantité d'organe des tissus suivants: rein, foie, intestin, muscle. Les prélèvements ont eu lieu après 2h.30, 6h.30 et 24 h.

Les tissus ont été broyés, puis triturés au mortier avec du sable.

Résultats, p. 78.

Récapitulation des résultats obtenus in vitro

au départ 1 cm ³ =0,1mg	1 cm ³ de liqueur surnageante contient en mg après		1 g de tissu contient en mg après 48 h.	
<u>Tissus de lapin anesthésié à l'uréthane (10 g de tissu)</u>				
	1 h.	3h.30	6 h.	
Foie	0,07 mg	0,066	0,012	0,24
Rein	0,07	0,054	0,018	0,6
Cerveau	0,06	0,015	0,012	0,6
<u>Tissus de chat anesthésié au chloroforme puis au chloralose (10 g de tissu)</u>				
	3 h.	20 h.	48 h.	
Foie	0,035 mg	0,025	0,012	0,1
Rein	0,06	0,025	0,012	0,1
Intestin	0,075	0,05	0,012	0,08
Cerveau	0,05	0,025	0,007	0,1
Muscle	0,04	0,025	0,012	0,09
<u>Tissus de cobaye sacrifié par saignée (tissus broyés au mortier avec du sable)</u>				
	2h.30	6h.30	24 h.	
Foie	0,015(?)mg	0,048	0,048	
Rein	0,048	0,045	0,045	
Muscle	0,030	0,024	0,015	
Intestin	0,054	0,06	0,06	

Interprétation: Dans les 3 séries d'analyses rapportées ici, il apparaît une diminution rapide de la concentration en chlorpromazine de la solution.

Si nous examinons en détail les résultats concernant les essais sur les tissus de chat, nous constatons qu'après 3 h, la concentration en chlorpromazine a diminué dans les proportions suivantes, rapportées à la valeur primitive.

Rein	Pourcentage de diminution:
Rein.....	40
Foie.....	65
Cerveau.....	50
Intestin.....	25
Muscle.....	55

Après 48 h., la diminution atteint:

Cerveau	93 %
Autres tissus	87

A ce moment, les tissus baignant dans la solution avaient une concentration en chlorpromazine approximativement 20 à 25 fois plus élevée que la solution.

On constate donc, dans tous les cas envisagés, une diminution rapide du taux de chlorpromazine de la solution.

Au contraire, les tissus qui baignent dans cette liqueur surnageante, se chargent considérablement en chlorpromazine; leur concentration pouvant être jusqu'à 25 fois plus élevée que celle de la solution.

V - REPARTITION DE LA CHLORPROMAZINE - ETUDE IN VIVO

GOUZON et ses collaborateurs, étudiant le dosage de la chlorpromazine dans différents secteurs tissulaires chez le chien, insistent sur les points suivants (62) :

- Il n'y aurait aucune proportionnalité entre la quantité de produit injecté et la concentration sanguine.

- La disparition de la substance dans le sang et le liquide céphalo-rachidien se ferait très rapidement. La concentration la plus élevée se retrouverait dans le système nerveux et au niveau du rein.

Les auteurs pensent à une fixation élective dans le système nerveux.

Pour BERTI (7), la chlorpromazine reste longtemps dans les tissus, mais la durée de cette présence est modifiée en fonction de la température, présentant un optimum à 18°. Ce produit manifeste un tropisme marqué pour le poumon, la moëlle et le rein.

Poursuivant nos recherches sur la fixation de la chlorpromazine dans les organes, nous avons étudié la répartition de ce médicament chez l'animal vivant (12).

Des travaux analogues ont été effectués simultanément aux nôtres par les auteurs italiens avec la chlorpromazine et la diéthazine (7) (8) (9).

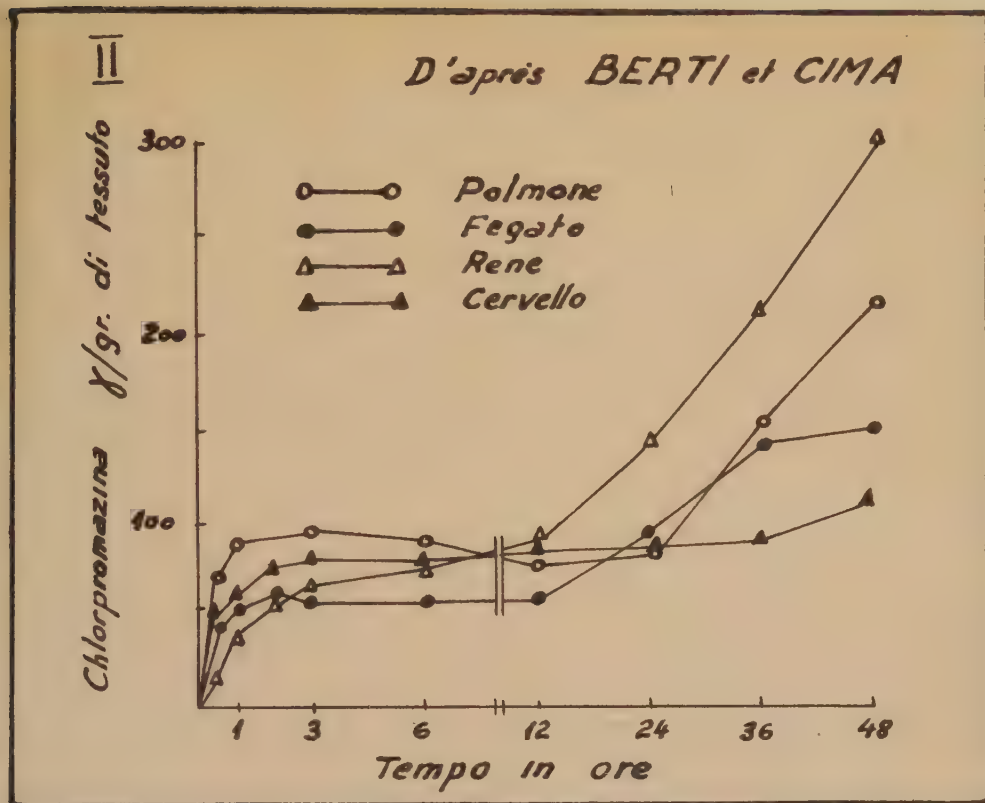
Il nous a donc paru intéressant de confronter les résultats obtenus de part et d'autre.

T. BERTI et L. CIMA ont injecté la chlorpromazine par voie sous-cutanée et à raison de 100 mg par kg aux animaux suivants: souris, rat, cobaye, lapin.

Les animaux sont sacrifiés successivement à des intervalles de temps réguliers répartis sur 36 heures en général, ce qui permet de suivre la marche de la fixation tissulaire.

Nous avons jugé utile de reproduire le graphique concernant les résultats obtenus par ces auteurs chez la souris (graphique II).

Les tissus analysés sont: le poumon (polmone), le foie (fegato), le rein (rene), le cerveau (cervello).



Analyse des tissus chez la souris.

Les résultats figurant sur le graphique montrent que :

- la diffusion du produit est lente chez la souris. (Il en est de même chez le rat; au contraire, elle est rapide chez le lapin et chez le cobaye).

- le poulmon se révèle comme l'organe le plus réceptif. GLAZKO et DILL (59) (60), ainsi que HALEY et BASSIN ont observé la même affinité du poulmon pour divers antihistaminiques (63), WAY et DAILEY pour la tripelenamine (114) et DAILEY et collab. pour la phenindamine (30).

- Il n'apparaît pas d'affinité particulière du médicament pour le tissu nerveux.

- Les animaux présentant les manifestations dépressives les plus marquées et les plus durables (rat, souris) sont ceux dont les organes détiennent une forte concentration de chlorpromazine et en restent le plus longtemps chargés.

Expériences personnelles:

Nous avons, après injection à l'animal, prélevé soit du sang, soit des tissus pour y doser le chlorpromazine qui y aurait diffusé.

I) Le sang

recueilli en général à la carotide sur de l'oxalate de potassium est agité et homogénéisé (0,08 g. d'oxalate pour 10 cm³ de sang).

2) les tissus

après décapitation (crapaud) ou section de la carotide chez l'animal vivant, ou saignée chez l'animal anesthésié, les tissus sont prélevés en vue du dosage de la chlorpromazine injectée auparavant.

Nos résultats rassemblés dans le tableau ci-joint et qui ont fait déjà l'objet d'une publication (12) ont été obtenus dans les conditions expérimentales suivantes:

Un cobaye et deux lots de cinq et six souris ont reçu 100 mg par kg de chlorpromazine par voie sous-cutanée.

I- Un cobaye de 700 gr a reçu une injection de 2,5 cm³ d'une solution de chlorpromazine intraveineuse, soit 62,5 mg. Ce qui représenterait, pour une répartition homogène dans tout le corps, 0,089 mg/g.

II- Deux lots de souris ont reçu 0,1 g. de chlorpromazine par kg. Pour une souris d'un poids moyen, la dose injectée sera de 2 mg, ceci sous un volume maximum de 0,5 cm³ et par la voie sous-cutanée.

Après une à deux heures, les souris manifestent des signes très nets de torpeur et présentent un claquement caractéristique du poumon à chaque mouvement respiratoire. Elles sont sacrifiées après 8 heures pour le premier lot et après 22 heures pour le second.

III- Trois crapauds ont reçu la même quantité, 100 mg par kg de chlorpromazine dans le sac lymphatique dorsal ou ventral. Ces animaux ont été sacrifiés après des temps variant de 2 h. 30 à 18 heures.

IV- Deux lapins ont reçu 325 mg de chlorpromazine répartis sur plusieurs injections, soit sous-cutanées, soit intra-musculaires.

Le premier lapin a été sacrifié après 3 jours, 3 heures après la dernière injection.

Le deuxième lapin traité dans les mêmes conditions a été sacrifié après un délai de 6 jours.

V- Un chien de 9 kg anesthésié au chloralose a reçu par voie intra-veineuse 5 cm³ de solution de chlorpromazine, c'est-à-dire 125 mg.

Dans le cas d'une répartition égale entre tous les tissus, la concentration théorique en chlorpromazine par gramme de tissu serait de : 0,0138 mg.

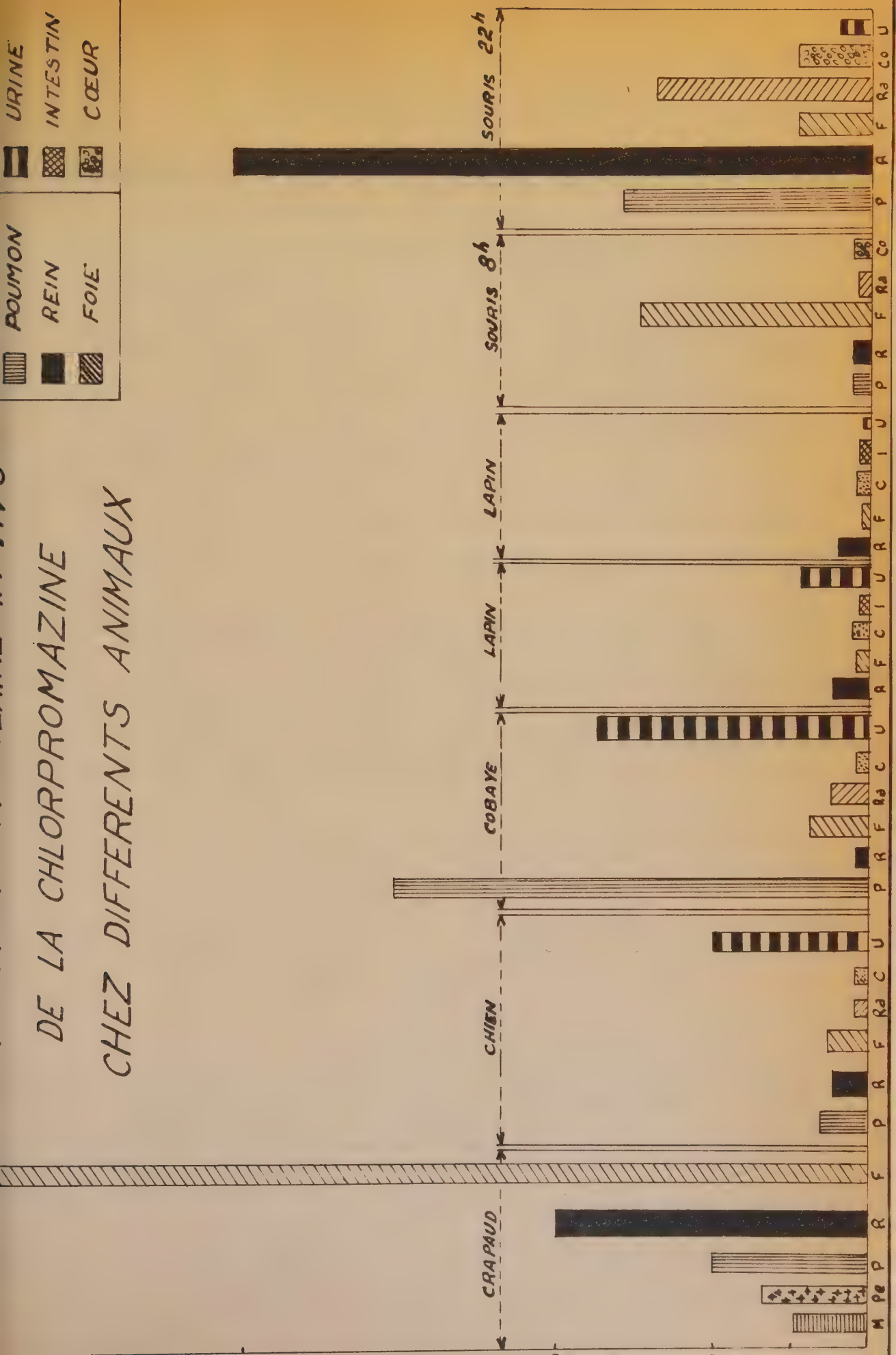
Résultats:

Le tableau ci-dessous va nous permettre de tirer les conclusions de ces analyses. Il ne concerne que les tissus, les essais sur le sang ayant tous été négatifs.

Les résultats ont été également figurés sous forme graphique (graphique III, p.84.)

animal sacrifié après un temps de	Dose et Voie d'introduction	Foie	Rein	Poumon	Cerveau	Coeur	Rate	Peau	Muscle	Urine
Cobaye: 2h.30	100 mg par kg.	0,042	0,014	0,360	0,006		0,03			0,180
Souris: 8 h.	100 mg par kg. Sous-cutanée	0,150	0,015	0,016		0,024	0,01			
22 h.	"	0,056	0,41	0,17		0,061	0,140			0,028
Crapaud: 2h.30	100 mg par kg. Sous-cutanée	0,6	0;2	0,1				0,07	0,048	
18 h.	"	0,6	0,24	0,56				0,07	0,048	
Chien chloralosé 3 h.	125 mg p. 9 kg. Intraveineuse	0,021	0,018	0,030	0,005		0,006			0,105
Lapin uréthanisé	100 mg Sous-cutanée	0,0024	0,024		0,0106				0,008	traces
Lapin : 3 jours	325 mg Sous-cutanée et Intra-musculaire	0,0075	0,028		0,013				0,012	0,054
6 jours	"	0	traces	traces	0				0	0

DE LA CHLORPROMAZINE CHEZ DIFFERENTS ANIMAUX



Interprétation:

Nos résultats montrent:

- 1) Une répartition tissulaire chez le cobaye identique à celle qu'ont trouvée BERTI et CIMA, notamment la forte concentration dans le tissu pulmonaire.
- 2) Chez la souris, la répartition que nous avons observée dans 2 lots d'animaux sacrifiés à 14 heures d'intervalle, ne se superpose pas à celle qu'obtenaient BERTI et CIMA, car nous voyons le foie s'appauvrir en chlorpromazine, alors que les autres tissus continuent à s'enrichir. Le rein en particulier acquiert une teneur très élevée (tous les organes continuaient à s'enrichir dans les expériences de BERTI et CIMA.)
- 3) Si le poumon n'est pas toujours l'organe le plus riche, sa teneur en chlorpromazine le classe parmi les tissus en retenant le plus.
- 4) Comme les auteurs italiens, nous n'observons pas de concentration élevée du médicament au niveau du tissu nerveux.
- 5) La chlorpromazine passe rapidement dans les urines dont la concentration peut être particulièrement élevée (cobaye, chien).
Ajoutons que l'effet congestionnant du médicament s'est manifesté chez le chien examiné par la présence dans les urines d'une forte quantité de sang. On y décelait également des pigments biliaires en abondance que nous avons identifiés par la réaction de Grimbert. On notait l'absence de sels biliaires et d'urobiline. La même observation a pu être faite chez des lapins.

Trois organes sont capables de capter des quantités importantes de chlorpromazine: le foie, le rein, et les poumons.

Les valeurs numériques concernant la répartition tissulaire chez tous les animaux examinés ne se prêtent pas à des comparaisons de détail valables étant donné les conditions expérimentales différentes.

Toutefois, la concentration extraordinairement élevée trouvée pour la chlorpromazine dans le foie de crapaud nous paraît témoigner peut-être une différence intéressante entre les organes de ce Batracien et ceux des mammifères.

C'est là une suggestion personnelle car, à notre connaissance, il n'a pas été fait de travaux concernant l'action de la chlorpromazine chez les Batraciens.

VI- LA CHLORPROMAZINE EST-ELLE LIEE AUX PROTEINES PLASMATIQUES?

Essais de dialyse.

Nous avons étudié la dialyse en sac de collodion de ce produit. Ces sacs ne réalisaient pas une membrane semi-perméable parfaite comme le montrent nos dosages de protéines. Nous n'avons donc réalisé ces expériences qu'à titre indicatif, le résultat devant orienter la poursuite de nos recherches.

Pour savoir si la chlorpromazine se lie ou non aux protéines, nous avons réalisé deux sortes de dialyse: l'une portait sur une solution en eau physiologique, l'autre sur une solution dans du sérum.

Puis, nous avons comparé la dialyse de la chlorpromazine à la dialyse de deux sulfamides: le sulfanilamide et le sulfafurazol, expérience que nous avons rapportée p. 58 .

1°) Dialyse d'une solution de chlorpromazine dans l'eau physiologique:

La dialyse de 10 cm³ est poursuivie pendant cinq heures contre 200 cm³ d'eau physiologique. La concentration initiale en chlorpromazine était de 0,1 g p. 1.000.

A l'issue de l'expérience, nous en retrouvons 0,042 g. p. 1.000.

2°) Dialyse d'une solution de chlorpromazine dans du sérum de boeuf:

Simultanément, nous avons réalisé deux dialyses, l'une du sérum contenant le médicament contre eau physiologique, l'autre contre eau distillée. Remarquons que dans la dialyse contre eau distillée, on observe une précipitation dans le sérum (due probablement aux euglobulines).

La dialyse a porté sur 10 cm³ de sérum contenant de la chlorpromazine à raison de 0,1 g. p. 1.000 pendant 5, 13 et 24 heures.

Voici les résultats obtenus dans ces diverses expériences.

Concentrations retrouvées en mg.
p. 1.000 dans le sac de collodion.
après:

Concentration au départ = 100 mg	5 h.	13 h.	24 h.
Dialyse contre :			
Eau distillée:	53,5	33	28,6
Eau physiologique:	54,1		29,2

Voici maintenant la concentration en protéines du sérum qui a subi la dialyse pendant 5 et 24 heures.

Taux de protéines totales en g pour I.000

Sérum au départ :	71,9 g.	
Après dialyse de	5 h.	24 h.
Contre eau distillée	30,3	26,36
Contre eau physiologique	50,24	36,3

Si nous comparons les résultats obtenus dans ces expériences, nous constatons que la présence de sérum a faiblement ralenti la dialyse de la chlorpromazine, mais nous n'osons présumer de ce résultat l'existence d'une liaison protéique.

Ajoutons que le passage d'une fraction protéique à travers la membrane conserve peut-être une valeur relative aux chiffres obtenus mais laisse subsister une certaine imprécision.

Nous noterons, en outre, que la dialyse est sensiblement la même, qu'elle soit menée contre eau physiologique ou contre eau distillée en dépit d'une filtration protéique plus importante en eau distillée.

3°) Dialyse d'une solution de chlorpromazine dans du plasma humain:

Malgré l'imperfection de la méthode, nous avons pensé qu'une comparaison des dialyses de la chlorpromazine et des sulfamides pouvait présenter quelque intérêt. Nous avons donc mené concurremment trois dialyses de plasma humain provenant d'un sang de transfusion:

2 sur les sulfamides : Sulfanilamide et sulfafurazol,
la 3ème sur la chlorpromazine.

Rappelons les résultats concernant les sulfamides:

On retrouve pour 10 cm³ de plasma analysé

des traces de sulfanilamide,

0,23 mg de sulfafurazol,

et l'expérience sur la chlorpromazine nous donne 0,48 mg
(la quantité initiale étant pour ces essais: 1 mg pour 10 cm³).

Des trois produits examinés, la chlorpromazine est donc le moins diffusible.

Il convient de remarquer que probablement la vitesse de dialyse doit être rapportée aux poids moléculaires des substances analysées qui sont respectivement:

172 (sulfanilamide)

243 (sulfafurazol)

355,32 (chlorpromazine).

La dialyse de la chlorpromazine est ralentie en présence de sérum, laissant présumer une liaison possible avec les protéines du plasma.

Comparée aux dialyses du sulfanilamide et du sulfafurazol, la dialyse de la chlorpromazine se révèle comme la plus lente.

Sur l'étude d'une liaison éventuelle: chlorpromazine - protéines.

Nous inspirant d'une expérience déjà citée (p. 7), nous avons réalisé un essai semblable avec la chlorpromazine. Il nous a conduit aux résultats suivants:

- La chlorpromazine en solution aqueuse à 1 p. 1.000 est totalement fixée par le noir animal employé à raison de 4 g. p. 100 cm³.
- La chlorpromazine en solution dans le plasma à une même concentration est fixée d'une manière identique.

Nous pouvons donner à cette constatation deux explications possibles:

- Ou bien la chlorpromazine ne se lie pas aux protéines,
- Ou bien, si elle se lie, elle est entièrement déplacée par le noir animal. En effet, les protéines ne sont pas retenues par le noir animal ou du moins si elles le sont, c'est dans une très faible proportion (1/20 dans le cas de notre expérience).

Si la chlorpromazine était liée aux protéines assez solidement pour ne pas être déplacée par le noir, elle serait entraînée par les protéines et se retrouverait donc en solution. Nous n'avons pas obtenu ce résultat.

C'est dire que s'il y a liaison chlorpromazine-protéines, il ne peut s'agir que d'une adsorption très labile, plus labile encore que celle qu'il contracte avec le noir animal.

II - DIETHAZINE (ou DIPARCOL) - MEPYRAMINE (ou NEO-ANTERGAN)

I - Généralités

II - Technique du dosage

III - La répartition tissulaire.

Etude in vitro

Etude in vivo.

I.- GENERALITES

La Diéthazine (Diparcol).

présente certaines analogies avec la chlorpromazine dont elle possède quelques-unes des propriétés.

En effet, ses usages essentiels reposent sur une action ganglioplégique et sur une intervention directe sur les centres nerveux.

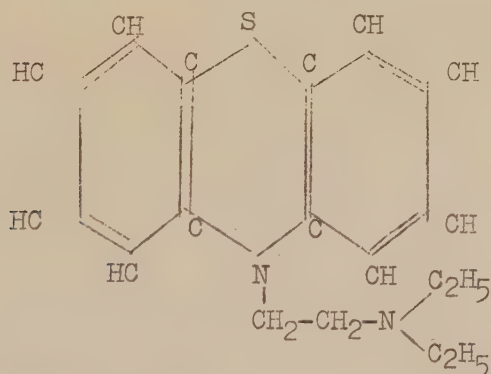
Il faut ajouter à ces activités une action spasmolytique et antihistaminique; si bien que la diéthazine manifeste son action sur tous les symptômes du syndrome parkinsonien.

Définition - Formule:

La diéthazine est le chlorhydrate de la (diéthylamino 2' éthyl 1') N dibenzo parathiazine



dont voici la formule développée:



PM = 334,9

, ClH

Sa dénomination commune adoptée par la Commission du Codex français est celle de Diéthazine et son nom déposé par la firme SPECIA, celui de Diparcol (2987 RP).

Répartition tissulaire:

A notre connaissance, les seuls travaux de recherche sur la répartition tissulaire sont ceux de BERTI et CIAA (8) (9).

D'après ces auteurs, chez la souris, la diéthazine atteint une concentration maxima une à trois heures après son introduction par voie sous-cutanée et à une température constante de 18 - 20° C.

Son taux diminue ensuite dans les différents organes prélevés:

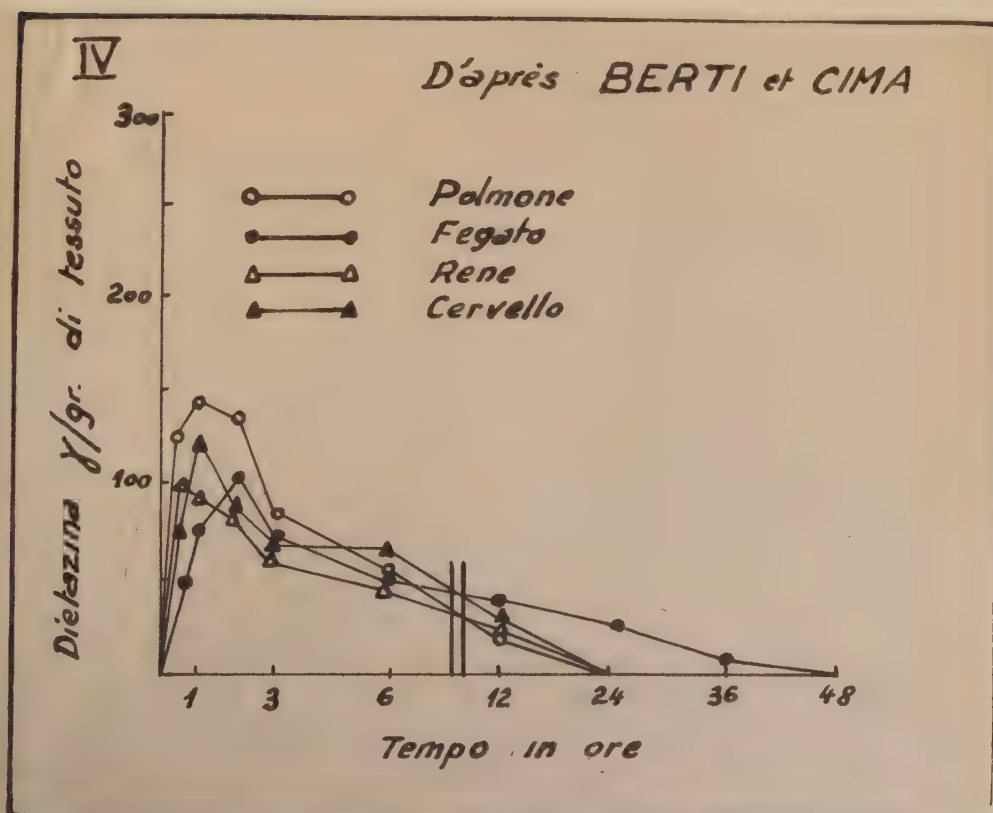
poumon, foie, rein, cerveau. Après une durée de 24 heures, on note même sa disparition dans le poumon (polmone), le rein (rene) et le cerveau (cervello)

Le foie (fegato) est l'organe qui en fixe le plus longtemps. La disparition du médicament n'a lieu qu'après 36 heures (graphique n°IV).

La détermination de la concentration des deux amino dérivés de la phénothiazine dans le poumon, le foie, le rein et le cerveau des souris blanches injectées par voie sous-cutanée a mis en évidence que la chlorpromazine et la diéthazine se distribuent dans l'organisme de façon remarquablement différente (graphique II, p. 81)

La chlorpromazine est en effet absorbée plus lentement au départ. Sa concentration augmente dans les tissus, du moins pendant 48 heures. Dans le rein, en particulier, la concentration augmente plus lentement mais rejoint après 12 heures une concentration nettement supérieure à celle des autres organes.

BERTI et CIMA pensent en conséquence à une faible élimination urinaire.



La Mépyramine (Néo-Antergan):

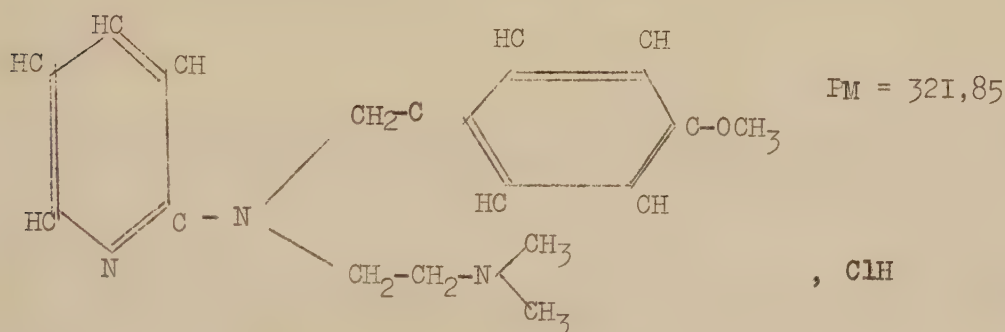
C'est un antihistaminique remarquable employé avec efficacité dans un grand nombre de syndromes anaphylactiques et principalement dans les manifestations cutanées.

Nous avons voulu rapprocher dans une même étude les 2 médicaments: diéthazine et mépyramine, d'autant plus qu'il est possible d'en suivre la répartition par une même réaction: l'oxydation en milieu sulfurique concentré utilisée déjà pour la chlorpromazine. Notons cependant que la mépyramine n'est pas un dérivé de la phénothiazine.

Définition - Formule:

La mépyramine est le chlorhydrate de la (diméthylamino éthyl) N para méthoxy - benzyl - N - aminopyridine.

Voici sa formule développée:



Sa dénomination commune adoptée par la Commission du Codex français est celle de Mépyramine et son nom déposé par la firme SPECIA celui de Néo-antergan (2786 R.P) (43).

Circulation dans l'organisme:

La mépyramine paraît subir dans l'organisme une certaine destruction. Chez l'homme, après injection de 0,3 g à 0,4 g, on n'a retrouvé dans l'urine que 0,6 à 2% de la dose administrée.

Chez le chien, après ingestion d'une dose de 25 mg par kg on ne retrouve dans les urines que 6 à 14,5 % du produit; après injection sous-cutanée d'une même dose, on retrouve 13 à 14 %.

II - TECHNIQUE DU DOSAGE DE LA DIETHAZINE ET DE LA MEPYRAMINE

Suivant DUBOST (46) la réaction colorée doit se pratiquer sur 1 cm³ de solution auquel on ajoute 5 cm³ de SO₄H₂ pur.

Pour la chlorpromazine, la réaction se développait dans un mélange à parties égales de solution et de SO₄H₂.

A concentration égale, le produit qui s'oxyde le moins est la diéthazine.

De plus, il n'y a pas proportionnalité aussi fidèle que pour la chlorpromazine entre la concentration de la solution et la coloration produite. Il est vrai que l'échantillon d'acide sulfurique employé intervient ici de manière beaucoup plus manifeste qu'avec la chlorpromazine et les colorations obtenues présentent des nuances qui se prêtent difficilement à des comparaisons de teinte.

Nous avons employé dans tous nos essais l'acide sulfurique pur Merck.

III - REPARTITION TISSULAIRE DE LA DIETHAZINE ET DE LA MEPYRAMINE.

Etude in vitro:

Comme pour la chlorpromazine, nous avons mis en contact des fragments de tissus découpés et une solution de diéthazine ou de mépyramine à 0,1 p. 1.000.

Des prélèvements de liqueur surnageante ont été soumis au dosage après des temps de contact différents variant de 1/2 h. à 24 h. Les tissus ont été analysés à la fin de l'expérience.

Résultats obtenus:

a) Diéthazine:

I- Tissus de lapin anesthésié à l'uréthane.

au lieu de 0,1 mg par cm ³	1 cm ³ de liqueur surnageante contient en mg, après:			1 g. de tissu contient, après:
	30 minutes	5 h. 30	24 h.	
Rein	0,09 mg	0,072 mg	0,012 mg	
Foie	0,09	0,024	0,009	0,069 mg
Cerveau	0,096		0,006	0,104
Intestin	0,09	0,072	0,054	

II - Tissus de rat sacrifié par saignée:

	1 g de tissu contient après 24 h.
Rein	0,05 mg
Foie	0,062
Cerveau	0,09

b) Mépyramine.

Tissus de lapin anesthésié à l'uréthane.

Au lieu de 0,1mg par cm ³	1 cm ³ de liqueur surnageante contient en mg après:			1 g. de tissu contient après
	30 minutes	5h.30	24 h.	24 h.
Rein	0,09 mg	0,079mg	0,055 mg	
Foie	0,079	0,055	0,037	0,031 mg
Intestin	0,09	0,075	0,055	

Interprétation:

- 1) Par rapport à la chlorpromazine, nous remarquons que la pénétration dans les tissus in vitro de la diéthazine (diparcol) et de la mépyramine (néo-antergan) est beaucoup plus lente, puisqu'après 30 minutes de contact, le taux de ces médicaments a très peu diminué dans la solution surnageante.
- 2) Le tissu intestinal n'absorbe en 24 heures dans les deux cas que la moitié environ de ces substances.
- 3) Les autres tissus mis en expérience manifestent une affinité nettement plus prononcée pour la diéthazine que pour la mépyramine.
- 4) La teneur en diéthazine dans le tissu cérébral en fin d'expérience est beaucoup plus élevée que celle des autres organes.

Etude in vivo:
=====

Nous avons pratiqué cet essai uniquement avec la diéthazine sur un chat anesthésié au chloralose.

50 mg de produit sont injectés par kg, soit 150 mg pour l'animal pesant 3 kg . La mort a eu lieu 6 heures après l'injection.

Chat sacrifié 6 heures après injection intraveineuse de 150 mg de diéthazine				
Concentration en mg par gramme de tissu	Foie	Rein	Cerveau	urine
	0,072	0,040	0,140	néant
Dans le sang: concentration après 30 minutes: 0,005 mg par cm ³				
" " 6 heures : traces				

Interprétation:

Dans une expérience réalisée in vivo, nous notons d'abord une rapide disparition de la diéthazine dans la circulation sanguine.

Nous observons que la concentration du médicament dans le foie, le rein et le cerveau est notable.

Nous remarquons enfin la teneur élevée du cerveau que nous n'osons interpréter sur ce seul essai. Cependant, en nous référant aux travaux de BERTI et CIMA (voir p.92), nous constatons que pour ces auteurs, le cerveau est également l'organe le plus riche. En outre, il y a une certaine similitude entre leurs résultats et les nôtres quant à la répartition relative du médicament.

- T R O I S I E M E P A R T I E -

=====

Etude de :

- STRYCHNINE

- SALICYLATE DE SODIUM.

Nous avons voulu voir comment se comportaient dans quelques essais analogues à ceux que nous avons imaginés pour la Chlorpromazine des substances médicamenteuses tout à fait différentes.

Nous avons porté notre choix, d'une part:

sur la strychnine, poison dont la recherche dans les tissus est un problème bien connu des toxicologues,

d'autre part:

sur le salicylate de sodium, médicament d'un emploi courant qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux.

I - Strychnine :

I - Généralités

II - Réactions communes à la strychnine et aux dérivés de la
phénothiazine

III - Technique du dosage

IV - Expériences:

sur les tissus

sur le sang.

- Généralités:

=====

Nous avons emprunté principalement à l'ouvrage de SOLLMANN (106) les quelques indications suivantes:

1) - Injectée par voie intra-veineuse, la strychnine ne se retrouve plus dans le sang, même très peu de temps après son administration. C'est ainsi qu'on a trouvé chez un chat une disparition de 30 p.100 du produit en 2 minutes et il n'est plus possible après 40 minutes, de déceler cet alcaloïde dans le sang.

2) - Lorsqu'on administre de la strychnine à un animal, le quart de la dose au moins ne peut être retrouvé ni dans ses excreta, ni dans ses tissus, si l'animal survit plus de 3 heures.

On pense donc qu'il n'y aurait pas seulement destruction, mais également disparition de la strychnine sous une forme combinée.

3) - Parmi les hypothèses qui expliquent la toxicité des alcaloïdes, figure celle d'une liaison avec les protéines. Cette liaison a été étudiée, in vitro, pour la strychnine en particulier, dans des expériences d'adsorption sur gélatine analogues à celles que nous avons signalées dans notre Introduction (p.4) (87)

4) - La répartition érythroplasmatisque étudiée in vitro a montré que la moitié ou plus de la strychnine passe dans les hématies (34) (III) (II2). Cet alcaloïde se trouverait donc dans les globules rouges à une concentration égale ou supérieure à la concentration plasmatique.

II - Réactions communes à la strychnine et aux dérivés de la phénothiazine:

Nous avons cité parmi les réactions de caractérisation de la chlorpromazine celles obtenues avec certains réactifs des alcaloïdes, si bien que l'identification et la recherche de la strychnine sont perturbées en présence de chlorpromazine et autres dérivés de la phénothiazine.

La chlorpromazine, en particulier, donne un précipité avec les réactifs de Mayer, de Bouchardat et le réactif de Bertrand à l'acide silicotungstique. Tous les réactifs de coloration des alcaloïdes contenant de l'acide sulfurique ou phosphorique concentrés donnent avec ce médicament une coloration rouge due à son oxydation (c'est la réaction que nous avons utilisée dans nos dosages), coloration qui prête à confusion. La sensibilité de ces réactifs peut être notable: le réactif de Mandelin permet de déceler 0,005 mg de chlorpromazine.

Au cours de la recherche préliminaire de la morphine dans une expertise toxicologique, l'essai au moyen de l'acide iodique est faussé par les dérivés de la phénothiazine.

Quant à la strychnine, sa caractérisation est particulièrement délicate puisque la réaction hydrostrychnique de Dénigès considérée comme spécifique de cet alcaloïde se produit également en présence de chlorpromazine.

C'est ainsi que R. Le BRETON et A. HERVE (77) ont relaté un cas d'intoxication mortelle par la chlorpromazine. L'examen toxicologique laissait supposer la présence dans les viscères de strychnine. Les essais physiologiques, difficiles d'ailleurs à réaliser, ne concordaient pas avec ce résultat. Ceci a incité les auteurs à se renseigner sur le traitement que le malade avait subi. Parmi les médicaments utilisés se trouvait la chlorpromazine dont 75 mg avaient été injectés trois jours avant la mort.

Une autre intoxication mortelle par ingestion massive volontaire de comprimés de 3356 R.P. ou (diéthylamino-2' propyl I') N - dibenzoparathiazine et d'Artane ou chlorhydrate de 3 (I pipéridyl)- 1 phényl-1 cyclohexyl - 1 propanol est rapportée par L. DEROBERT et ses collaborateurs (35). Toutes les réactions des alcaloïdes citées se sont révélées positives.

Tout récemment, devant ces difficultés, des méthodes de différenciation de la strychnine et des dérivés de la phénothiazine ont été proposées.

Pour JAULMES et BARRAL (73), il suffit de se placer dans des conditions bien déterminées pour obtenir des réactions chimiques qui soient à la fois sensibles et spécifiques des alcaloïdes.

De leur côté, DUQUENOIS et MATHIS (49), puis PHILIBERT (88), préconisent une méthode de séparation de ces médicaments par chromatographie sur papier. Les premiers utilisent comme solvant, soit le butanol chlorhydrique, soit l'eau chlorhydrique et révèlent les spots par le réactif de Dragendorff. La meilleure séparation est obtenue avec l'eau chlorhydrique: le Rf de la strychnine est égal à 0,76, celui de la chlorpromazine, à 0,47.

PHILIBERT réussit à séparer quantitativement la strychnine des dérivés de la phénothiazine par chromatographie sur papier phosphaté.

Il n'en reste pas moins vrai que dans l'analyse toxicologique courante, la présence de dérivés de la phénothiazine peut être la source de difficultés, voire même d'erreurs par la similitude des réactions qu'ils présentent avec les alcaloïdes, la strychnine en particulier, si on ne prend pas certaines précautions.

III - Technique du dosage:

Tous les dosages de strychnine sont basés sur la réaction de Malaquin-Dénigès: réduction de la strychnine en tétrahydrostrychnine et coloration en présence de nitrite de sodium.

Nous avons choisi la technique de ROLLAND-LECLERCQ (94).

Dans nos essais, nous avons fait précéder le dosage d'une hydrolyse potassique, puis nous avons pratiqué deux extractions à l'éther. Les solutions éthérées sont évaporées dans de grands tubes où se fera la réaction colorée.

Le résidu d'évaporation est dilué dans 5 cm³ d'eau distillée. On ajoute 5 cm³ d'HCl pur et 3 g. de zinc amalgamé.

Nous avons préparé ce zinc amalgamé suivant les indications de KOHN ABREST: on mélange à poids égaux du zinc et du mercure. On chauffe jusqu'à fluidification. On laisse refroidir et on concasse l'amalgame en fragments de la dimension d'un gros pois. Cet amalgame s'est montré bien préférable aux aiguilles de zinc amalgamé obtenues par immersion dans une solution diluée de chlorure mercurique. L'emploi de zinc amalgamé nous a paru absolument nécessaire, le zinc traité par HCl pur (qui est indiqué dans certaines techniques) ne nous a pas donné de résultats fidèles.

On porte ensuite au B.M. bouillant pendant 20 minutes. On refroidit. On filtre et on complète à 20 cm³.

On ajoute deux gouttes de nitrite de sodium à 1 p.1000 fraîchement préparé.

Il apparaît une coloration rouge qui est lue au photomètre dans le vert à 530 m μ .

Dans nos conditions opératoires, la sensibilité de la réaction est: 0,02 mg dans la prise d'essai.

IV - Expériences:

I) Sur les tissus.

Des fragments de tissus de deux cobayes sacrifiés par saignée sont immergés dans une solution de sulfate de strychnine à 1 mg par cm³ dans l'essai n° 1, et à 0,1 mg par cm³ dans l'essai n° 2.

Les résultats des dosages effectués dans les liqueurs surnageantes après des temps de contact variables avec les tissus figurent dans les tableaux ci-après:

Essai n° 1:

I - Tissus de cobaye découpés en minces fragments:

Au lieu de 1 mg par cm ³	1 cm ³ de liqueur surnageante contient en mg après:		
	2h.30	6h.30	24 h.
Rein	0,9 mg	0,8 mg	0,6 mg
Foie	0,8	0,7	0,6
Intestin	0,8	0,8	0,7
Poumon	0,9	0,8	0,8

Essai n° 2:

II - Tissus de cobaye broyés avec du sable et triturés au mortier:

Au lieu de 0,1 mg par cm ³	1 cm ³ de liqueur surnageante contient en mg après:	
	2 h.30	6 h.30
Rein	0	0
Foie	0	0
Intestin	0	0
Muscle	0	0
Poumon	0,04 mg	0,04 mg

Interprétation:

1) En présence d'une faible quantité de strychnine (à concentration semblable à celle réalisée pour les médicaments précédents), il n'est plus possible de mettre en évidence cet alcaloïde dans les solutions où baignent l'intestin, le rein, le foie, le muscle. Seul le poumon n'a pas absorbé toute la strychnine.

2) Pour une concentration dix fois plus forte en strychnine, les résultats montrent un appauvrissement progressif de la solution, mais la concentration demeure importante.

Sur le sang:
=====

Nous avons opéré sur du sang frais de cobaye. L'animal a été sacrifié par saignée, le sang prélevé à la carotide a été recueilli sur oxalate de potassium.

5 cm³ de sang ont été additionnés de 5 cm³ d'une solution contenant 0,45 mg de sulfate de strychnine.

L'hématocrite du sang ainsi dilué correspondait à :

Globules rouges	200 cm ³
Plasma	800 cm ³

Le plasma et les globules rouges ont été analysés séparément.

Voici les résultats obtenus:

	Sulfate de strychnine en mg	
	par cm ³	dans 10 cm ³ de sang
Plasma	0,0074	0,059
G.R.	0,021	0,042
		Total 0,101

Nous retrouvons donc, dans 10 cm³ de sang, 0,101 mg de sulfate de strychnine alors que nous en avons mis 0,45 mg. Le déficit est énorme.

Nous pensons que l'erreur porte sur les globules rouges. En effet, VAVRA et KIDERY (III) (II2) ont insisté sur la dissimulation de la strychnine dans les globules rouges: des hématies mises en présence d'une solution de strychnine lui font perdre une part importante de sa toxicité, mais ce qui a disparu de la solution ne se retrouve pas intégralement dans ces hématies.

Comparons les résultats de cette expérience sur la strychnine avec ceux qui ont été obtenus avec la chlorpromazine dans une expérience identique pratiquée sur le même sang (p.74): nous constatons même en faisant abstraction du déficit, que la répartition érythroplasmatisque se fait dans le même sens dans les deux cas, le taux globulaire de la strychnine et de la chlorpromazine est supérieur à leur taux plasmatique.

II - Salicylate de sodium.

I - Généralités

II - Expériences

in vitro

I - Généralités: =====

(I) Existence d'une liaison salicylate de sodium - protéine. =====

Le salicylate de sodium est susceptible de se lier aux protéines plasmatiques en forte proportion (44). Il peut également se lier à la polyvinylpyrrolidone (ou subtosan) (86), dont nous avons déjà signalé la capacité de liaison au cours de notre étude des sulfamides.

In vitro, le salicylate diffusible a été trouvé respectivement égal à 30 - 125 - 250 mg pour des concentrations totales de 200 - 400 - 500 mg p. 100. C'est à dire que 50 p.100 ou plus du médicament sont liés aux protéines du plasma (44).

Il ne s'agit pas d'une combinaison car l'indice de réfraction du sérum n'est pas modifié (55), mais on peut affirmer que la liaison résulte d'une adsorption comme l'ont montré par des expériences de dialyse CHABANIER et ses collaborateurs (23).

GALIMARD a confirmé cette adsorption: dans un sérum additionné de salicylate de sodium le précipité de protéines qui se forme lorsqu'on verse de l'acide trichloracétique entraîne une partie du salicylate.

Cette fixation aux protéines n'est cependant pas très solide, car à l'électrophorèse sur papier, le salicylate se révèle en avant de l'albumine (97).

Le salicylate de sodium se fixe à la fois aux albumines et aux globulines, mais à des taux très différents: il se lie, en effet, en quantité 5 à 7 fois plus grande avec les albumines qu'avec les globulines (57).

(2) Importance pharmacodynamique de la liaison protéique du salicylate de sodium. =====

GALIMARD (56) a observé que l'adsorption protéique la plus forte se produit quelque temps après l'injection intraveineuse. Ceci pourrait s'expliquer de la façon suivante:

L'élimination urinaire du salicylate rendrait libres des protéines, et celles-ci seraient capables d'adsorber alors des quantités de salicylate plus grandes qu'au début, comme s'il y avait une sorte d'adaptation de l'affinité des protéines pour le salicylate.

Si le traitement est interrompu, le salicylate se trouve à nouveau dans un organisme neuf. Et GALIMARD en tire les conséquences thérapeutiques suivantes:

- au début, il y a envahissement du sérum; de petites doses se montrent actives, il est inutile d'employer des doses plus fortes.

- ensuite, le salicylate s'élimine et s'adsorbe aussi davantage. Il devient donc moins libre et vraisemblablement moins actif: il faut augmenter les doses.

- enfin, il faut de temps à autre interrompre le traitement pour que le sérum reprenne son "élasticité", afin qu'il puisse exister à nouveau une quantité importante de salicylate libre dans ce sérum.

(3) Répartition tissulaire et érythroplasmatique du salicylate de sodium.
=====

a) La répartition tissulaire: La répartition tissulaire observée chez des lapins a montré que le médicament se concentre dans le foie et dans le rein (25).

La répartition observée chez des rats est différente. Elle paraît proportionnelle à la quantité d'eau contenue dans les tissus (105).

b) La répartition érythroplasmatique:

La répartition érythroplasmatique du salicylate a été étudiée en particulier par CLICHE (25). Cette répartition est en faveur des hématies. In vivo, chez le lapin, le rapport de la concentration globulaire à la concentration plasmatique est en moyenne égal à 1,75.

Il ne semble pas d'après d'autres travaux, d'après (84) et (106), que cette répartition soit vraiment bien connue dans d'autres conditions.

II - Expériences in vitro:
=====

Nous n'avons étudié sur ce médicament que la répartition in vitro. N'ayant pas fait de dosage en milieu biologique, nous avons employé directement la réaction au perchlorure de fer qui se traduit par une coloration violette.

Des fragments de divers tissus ont été prélevés sur un chat sacrifié après anesthésie. Ils ont été mis en contact avec une solution de salicylate de sodium à 1 g. p.1000.

Des échantillons des liqueurs surnageant les tissus ont été prélevés après des temps de contact de:

40 minutes 1h.45 3 h. 4 h. 18 h.30.

Dans tous les essais et pour tous les temps de contact, les colorations obtenues sont identiques entre elles et identiques à celle de la solution témoin.

On peut donc conclure que, dans nos conditions expérimentales, le salicylate ne pénètre pas dans les tissus.

Le salicylate de sodium ne présente pas d'affinité pour les tissus in vitro. C'est là un comportement tout à fait opposé à celui des autres substances envisagées précédemment.

- CONCLUSION -
=====

Nous nous étions proposé dans notre Travail d'étudier sous quelle forme divers médicaments circulaient dans l'organisme et s'ils possédaient une affinité particulière pour certains tissus.

L'activité thérapeutique dépend, en effet, pour une grande part, des liaisons que ces drogues peuvent contracter en milieu biologique aussi bien dans le sang que dans les organes.

Nous avons d'abord envisagé brièvement le rôle joué par les protéines plasmatiques et par les globules rouges dans le transport des substances organiques et minérales.

Dans une PREMIERE PARTIE, nous avons étudié les Sulfamides.

Nous avons envisagé les différents facteurs susceptibles de modifier la répartition érythroplasmatisque de ces médicaments dans l'organisme: pH, agitation, durée de contact, sang utilisé et ses substituants, concentration du sulfamide.

Nous avons ainsi été amenée à constater, dans des essais in vitro, que seule entrait en jeu l'hématocrite.

Le sulfafurazol, principe actif de la Gantrisine a retenu plus particulièrement notre attention en raison de son comportement biologique qui le différencie sur plusieurs points des autres sulfamides.

Le dosage du sulfafurazol présente des difficultés qui nous ont contraint à préciser les conditions nécessaires pour réaliser des analyses moins inexactes, aussi bien dans le domaine clinique que dans des essais de laboratoire.

Nous pensons avoir ainsi pu expliquer les résultats contradictoires obtenus jusqu'ici et nous avons été amenée à la suite d'une longue expérimentation à rapprocher le sulfafurazol de certains autres sulfamides, en particulier au point de vue de son affinité pour les protéines plasmatiques et de sa faible rétention globulaire.

Dans une DEUXIEME PARTIE, nous nous sommes adressée à un médicament que ses propriétés spéciales et très étendues ont placé en quelques années au premier rang des médications actuelles, la chlorpromazine ou Largactil, et nous l'avons étudié sur un plan comparatif.

La distribution de ce médicament dans l'organisme, les modifications qu'il peut subir sont mal connues. Nous avons, dans ces conditions, étudié dans le détail la répartition érythroplasmatisque de ce produit in vitro et montré qu'il présente une grande affi-

nité pour les hématies.

De nombreuses expériences pratiquées in vitro ont révélé que la chlorpromazine était absorbée avec une rapidité surprenante par les tissus. Cette observation a été confirmée in vivo et nous avons pu déterminer la répartition tissulaire de ce médicament chez de nombreux animaux. Le foie, le poumon et le rein se sont montrés les organes les plus riches.

Nous avons rapproché de la chlorpromazine deux médicaments également très employés, la diéthazine ou Diparcol, et la mépyramine ou Néocantergan, auxquels nous avons consacré une étude similaire mais plus réduite. Ces médicaments se comportent de façon assez voisine de la chlorpromazine.

Enfin, dans une TROISIEME PARTIE, nous avons réuni, dans des essais inspirés par des préoccupations identiques à celles qui nous avaient dirigée précédemment, deux substances médicamenteuses très différentes: le sulfate de strychnine et le salicylate de sodium.

Nos analyses nous ont conduite aux conclusions suivantes:

la strychnine, qui se rapproche des dérivés de la phénothiazine par un certain nombre de réactions chimiques est, de la même manière que ces derniers, rapidement absorbée par les tissus in vitro,

au contraire, le salicylate de sodium ne présente aucune affinité tissulaire et se conduit ainsi très différemment des autres substances envisagées dans cette étude.

Parmi les médicaments que nous avons étudiés au cours d'essais in vitro en particulier, il est déjà possible de distinguer plusieurs catégories:

- certaines substances ont une affinité très marquée pour les hématies et les tissus, par exemple: la chlorpromazine et le sulfate de strychnine.

- d'autres se répartissent d'une manière moins inégale. Tel est le cas de la plupart des sulfamides en allant du sulfanilamide très diffusible au sulfafurazol qui pénètre difficilement dans les tissus.

- enfin, d'autres ne se fixent pas du tout sur les tissus, le salicylate de sodium en est le représentant.

- BIBLIOGRAPHIE -

=====

- (I) ALLINE (M.).- La circulation des produits sulfamidés chez l'Homme.
Ann. pharm. fr. 1946, 4, 56.
- (2) ANDERSEN (A.H.).- On fixation of sulfathiazole, sulfapyridine, sulfanilamide and para-aminobenzoic acid by plasma.
Acta pharm. toxicol. 1945, I, 141.
- (3) ANDERSEN (A.H.), MOLLER (K.O.), SIMESSEN (M.H.).- Über die Zustandsform von Sulfathiazol im Blut, Urin and in Cerebrospinalflüssigkeit.
Arch. exp. Path. Pharmac. 1942, 199, 528.
- (4) BELL (P.H.), ROBLIN (R.O.).- Studies in Chemotherapy. VII A theory of the relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds.
J. Am. Chem. Soc. 1942, 64, 2905.
- (5) BENHAM (G.H.).- The fate of phenothiazine in rabbits. I The detection of a new conjugate in rabbits'urine after the feeding of phenothiazine.
Canad. J. Res. 1945, 23, Sec. E., 71.
- (6) BENNHOLD (H.).- Über die Vehikelfunktion der Serumeiweisskörper.
Ergebn. inn. Med. Kinderh. 1932, 42, 273.
- (7) BERTI (T.).- Struttura a distribuzione nell'organismo di aminoderivati fenotiazinici.
Il Farmaco, 1954, 9, 374.
- (8) BERTI (T.), CIMA (L.).- Distributione degli aminoderivati fenotiazinici nell'organismo animale. I. Ricerche nel topo con la clorpromazina e la dietazina.
Arch. intern. Pharmacod. 1954, 98, 452.
- (9) BERTI (T.), CIMA (L.).- II. Ricerche in diverse specie animali con la clorpromazina.
Arch. intern. Pharmacod. 1955, 100, 373.
- (10) BESSON (S.), DUPAIX-LASSEUR (A.).- Etude de la fixation par les hématies humaines de la pénicilline et de la dihydrostreptomycine seules ou associées au mercure ou au cuivre.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1952, N° 47, 3.
- (II) BESSON (S.), LEDER (M.).- La répartition de la chlorpromazine (4560 RP ou Largactil) dans le sang et dans les tissus. Etude in vitro.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1954, n° 23, 7.

- (12) BESSON (S.), LEDER (M.).- Répartition tissulaire de la chlorpromazine chez quelques animaux.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1955, n° 25, 13.
- (13) BESSON (S.), LEDER (M.).- Le dosage de la Gantrisine dans le sang.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1955, séance du 1-12 (sous presse).
- (14) BESSON (S.), LEDER (M.).- La Gantrisine (sulfafurazol) est-elle liée aux protéines plasmatiques.
Bull. Soc. Sciences Nancy, 1955, séance du 8-12 (sous presse).
- (15) BOULANGER (P.).- Le rôle des hématies dans le transport et la mise en réserve des substances minérales et organiques.
IIème Partie.
J. Physiol. 1952, 44, 381.
- (16) BRATTON (A.C.), MARSHALL (E.K.).- A new coupling component for sulfanilamide determination.
J. biol. Chem. 1939, 128, 537.
- (17) BRIGNON (J.J.).- Méthode de dosage rapide du Largactil dans le sérum humain.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1955, n° 24, 13.
- (18) BRIGNON (J.J.).- Dosage du Largactil dans les urines.
Bull. Soc. Pharm. Nancy, 1955, n° 25, 17.
- (19) BROSS (W.), KUBIKOWSKI (P.).- Experimentelle Untersuchungen über die Adsorptionsfähigkeit der roten Blutkörperchen in Beziehung zu den im Blut kreisenden Stoffen mit besonderer Berücksichtigung des Adrenalins und die biologische Bedeutung dieses Phänomens.
Arch. exp. Path. Pharmac. 1935, 178, 212.
- (20) BRYER (M.S.), SCHOENBACH (E.B.), OTT (C.E.), LONG (P.H.).- The experimental pharmacology and effectiveness of 3-4 dimethyl-5-sulfanilamidoisoxazol.
Bull. Johns Hopk. Hop. 1948, 82, 633.
- (21) BURN (J.H.).- The pharmacology of chlorpromazine and promethazine.
Proc. Roy. Soc. Med. 1954, 47, 617.
- (22) CARLSON (W.W.), CRETCHER (L.H.).- The blood distribution and toxicity of several Cinchona alkaloid derivatives.
J.A.P.A. , 1951, 40, 471.
- (23) CHABANIER (H.), LEBERT (M.), LOBO-ONEILL (C.).- De l'adsorption du salicylate de soude par le sérum sanguin.
C.R. Soc. Biol. 1923, 88, 178.

- (24) CHRISTENSEN (H.N.), RIGGS (Th.R.), RAY (N.E.).- Concentrative uptake of aminoacids by erythrocytes in vitro.
J.biol. Chem. 1952, 194, 41.
- (25) CLICHE (E.).- Etude de la répartition érythroplasmatique de quelques médicaments organiques. Son importance en toxicologie.
Thèse Pharm. Paris, 1935.
- (26) COOPER (F.B.), GROSS (P.), HAGAN (H.L.).- Determination and distribution of sulfathiazol in blood.
Am. J. Clin. Pathol. 1942, 12, 149.
- (27) CORDIER (D.).- Le rôle des hématies dans le transport et la mise en réserve des substances minérales et organiques. Ière partie.
J. Physiol. 1952, 44, 353.
- (28) COURVOISIER (S.), FOURNEL (J.), DUCROT (R.), KOLSKY (M.), KOETSCHET (P.).- Propriétés pharmacodynamiques du chlorhydrate de chloro-3 (diméthylamino -3' propyl) - 10 phenothiazine (4560 RP).
Arch. intern. Pharmacod. 1953, 92, 305.
- (29) CROSNIER (R.).- La sulfamidothérapie en pratique médicale.
Actual. méd. et pharm. 1944.
- (30) DAILEY (R.E.), WAY (E.L.), PARIKH (J.R.), CHEN-YU SUNG.- Absorption, distribution and excretion of phenindamine (Thephorin).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1950, 74, 394.
- (31) DAVIS (B.D.).- Binding of sulfonamides by plasma proteins.
Science 1942, 95, 78.
- (32) DAVIS (B.D.).- The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body.
J. clin. Invest. 1943, 22, 753.
- (33) DAVIS (B.D.), WOOD (W.B.).- Studies on antibacterial action of sulfonamide drugs. III Correlation of drug activity with binding to plasma proteins.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942, 51, 283.
- (34) DEQUIDT (J.).- Les échanges érythroplasmatiques d'aminoacides en présence d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine.
Thèse Pharm. Lille, 1954.
- (35) DEROBERT (L.), LE BRETON (R.), MARTIN (R.).- Intoxication mortelle par ingestion de médicaments ganglioplégiques.
Ann. Méd. lég. Criminol. 1954, 34, 144.

- (36) DEROUAUX (G.).- Liaison sulfamide-protéine et passage des sulfamidés dans le liquide céphalorachidien.
Acta biol. belgica, 1943, 3, 170.
- (37) DEROUAUX (G.).- Liaison sulfamide-protéine, diffusion générale et acétylation des sulfamidés.
Acta biol. belgica, 1943, 3, 180.
- (38) DEROUAUX (G.).- Liaison sulfamide-protéine, diffusion générale et élimination rénale des sulfamidés.
Acta biol. belgica, 1943, 3, 231.
- (39) DEROUAUX (G.).- Contribution à l'étude expérimentale des bases rationnelles de la sulfamidothérapie.
Rev. belg. Pathol. Méd. expérim. 1950, 20, Supplément 5.
- (40) DERVICHIAN (J.).- Physicochimie de l'action biologique des agents chimiques.
Exposés annuels de Biochimie médicale, t.XVI, 1954.
- (41) DEWEY (H.M.), WORMAL (A.).- Studies on suramin (antrypol = Bayer 205) - V The combination of the drug with the plasma and other proteins.
Bioch. J. 1946, 40, 119.
- (42) Documentation ROCHE.
- (43) Documentation SPECIA.
- (44) DRILL (V.A.).- Pharmacology in Medicine, New-York, Toronto, London, 1954.
- (45) DRUEY (J.), OESTERHELD (G.).- Zur Bestimmung des Cibazols und anderer sulfanilamide.
Helv. Chim. Acta, 1942, 25, 753.
- (46) DUBOST (P.).- Dosage du Néo antergan dans l'urine.
Ann. pharm. fr. 1949, 7, 139.
- (47) DUBOST (P.), PASCAL (S.).- Dosage du Largactil dans les liquides biologiques. Etude du passage dans l'organisme animal.
Ann. pharm. fr. 1953, 11, 615.
- (48) DUBOST (P.), PASCAL (S.).- Dosage du Largactil dans les liquides biologiques. Note complémentaire.
Ann. pharm. fr. 1955, 13, 56.
- (49) DUQUENOIS (P.), MATHIS (Cl.).- La caractérisation de la chlorpromazine en toxicologie.
Ann. Méd. lég. Criminol. 1954, 34, 226.

- (50) FASCIAUX (J.P.).- Les sulfamides, Etude chimique, biochimique et pharmacodynamique.
Thèse Pharm. Lille, 1943.
- (51) FISHER (S.H.), TROAST (L.), WATERHOUSE (A.), SHANNON (J.).- The relation between chemical structure and physiological disposition of a series of substances allied to sulfanilamide.
J. Pharm. exp. Ther. 1943, 79, 373.
- (52) FOX (C.L.), ROSE (H.M.).- Ionisation of sulfonamides.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942, 50, 142;
- (53) FRISK (A.R.).- The renal clearance of various sulfanilamide derivatives and the distribution of free and conjugated compound between corpuscles and plasma in man.
Acta med. scand. 1941, 106, 404.
- (54) FRISK (A.R.).- Sulfanilamide derivatives. Chemotherapeutic evaluation of N^I substituted sulfanilamides.
Acta med. scand. 1943, Supplément 142.
- (55) GALIMARD (J.E.).- Métabolisme du salicylate de sodium. III. Adsorption in vitro par le sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol. 1945, 27, 206.
- (56) GALIMARD (J.E.).- VII Variations physiologiques de l'adsorption sérique du salicylate de sodium. Conséquences thérapeutiques.
Bull. Soc. chim. biol. 1950, 32, 143.
- (57) GALIMARD (J.E.).- Eléments sériques sur lesquels s'adsorbe le salicylate.
Bull. Soc. chim. biol. 1950, 32, 151.
- (58) GILLIGAN (D.R.).- Blood levels of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in relation to binding in the plasma.
J. Pharm. exp. Therap. 1943, 79, 320.
- (59) GLAZKO (A.J.), DILL (W.A.).- Biochemical studies on diphenhydramine (Benadryl) II. Distribution in tissues and urinary excretion.
J. Biol. Chem. 1949, 179, 403.
- (60) GLAZKO (A.J.), DILL (W.A.).- Biochemical studies on diphenhydramine (Benadryl) IV Degradation of Benadryl by tissue enzymes.
J. Biol. Chem. 1949, 179, 417.
- (61) GOLDSTEIN (A.).- The interactions of drugs and plasma proteins.
Pharmacol. Reviews, 1949, 1, 102.

- (62) GOUZON (B.), PRUNEYRE (A.), DONNET (V.).- Dosage de la chlorpromazine dans différents secteurs tissulaires.
C.R. Soc. Biol. 1954, 148, 2039.
- (63) HALEY (J.), BASSIN (M.).- Tissue distribution of several antihistamines one hour after administration.
J. Pharm. exp. Therap. 1951, 103, 345.
- (64) HANSEN (L.).- Distribution of free and conjugated sulfanilamide and sulfapyridine between corpuscles and plasma in both human and rabbit blood.
J. Lab. clin. Med. 1939, 25, 669.
- (65) HANSEN (L.).- Sulfanilamide concentration and distribution in blood and urine in sulfanilamide therapy for gonococcic infections in men.
J. Pharm. exp. Therap. 1939, 65, 372.
- (66) HAWKING (F.).- The rate of diffusion of sulfonamide compounds.
Quart. J. Pharm. Pharmacol. 1941, 14, 226.
- (67) HEINEMANN (M.).- Distribution of sulfonamide compounds between cells and serum of human blood.
J. clin. Invest. 1943, 22, 29.
- (68) HERBERTS (G.).- The influence of infection on the distribution of sulfanilamide derivatives in blood, cerebrospinal fluid and tissue.
Acta oto-laryngologica 1944, Supplément 55.
- (69) HIATT (E.P.), QUINN (G.P.).- The distribution of quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine in fluids and tissues of dogs.
J. Pharmacol. exp. Therap. 1945, 83, 101.
- (70) HIGUCHI (T.), KURAMOTO (R.).- Study of possible complex formation between macromolecules and certain Pharmaceuticals
I-Polyvinylpyrrolidone with sulfathiazole, procaine hydrochloride, sodium salicylate, benzylpenicillin, chloramphenicol, mandelic acid, caffeine, theophylline and cortisone.
J.A.P.A. (Sc. ed.), 1954, 43, 393.
- (71) HIGUCHI (T.), KURAMOTO (R.).-
II-Polyvinylpyrrolidone with p.aminobenzoic acid, aminopyrine, benzoic acid, salicylic acid, p. hydroxybenzoic acid, m. hydroxybenzoic acid, citric acid and phenobarbital.
J.A.P.A. (Sc. ed.), 1954, 43, 398.

- (72) JANOT (M.M.).- Les penicillines à action prolongée (Penicillines- retard).
Ann. pharm. fr. 1950, 8, 46.
- (73) JAULMES (P.), BARRAL (P.).- La différenciation chimique de la strychnine et des dérivés de la phénothiazine.
Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1955, 15, 18.
- (74) KIMMIG (J.), TESELMANN (H.).- Die Bildungsverhältnisse zwischen Bluteiweisskörper und sulfonamiden.
Arch. Dermat. Syphil. 1942, 182, 436.
- (75) LANGECKER (H.), SCHULZE (E.).- Die Verteilung von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und sulfacarbamid auf die Phasen des Blutes, liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.
Arch. exp. Pathol. Pharmac. 1953, 221, 160.
- (76) LANGEMANN (H.).- Klinische Untersuchung eines neuen Sulfonamidpräparates: "Cantrisin Roche" 3-4 dimethyl 5 sulfanilamidoisoxazol.
Schweiz. Med. Wschr. 1950, 80, 78.
- (77) LE BRETON (R.), HERVE (A.).- Quelques difficultés toxicologiques dues à l'utilisation des dérivés de la phénothiazine.
Ann. Med. lég. Criminol. 1954, 34, 125.
- (78) MARSHALL (E.K.).- Distribution of 3,4 dimethyl -5- sulfanilamidoisoxazol in the body.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1948, 68, 472.
- (79) MARSHALL (E.K.), EMERSON (K.), CUTTING (W.D.).- The distribution of sulfanilamid in the organism.
J. Pharm. exp. Therap. 1937, 61, 196.
- (80) MARSHALL (E.K.), LITCHFIELD (J.T.).- Some aspects of the pharmacology of sulfapyridine.
J. Pharm. exp. Therap. 1939, 67, 454.
- (81) MAYNERT (E.W.), VAN DYKE (H.B.).- The metabolism of barbiturates
Pharmacol. Reviews 1949, 1, 217.
- (82) Mc LEAN (F.C.), HASTINGS (A.B.).- Clinical estimation and significance of calcium-ion concentration in blood.
Am. J. med. Sc. 1935, 189, 601.
- (83) MEADS (M.), FINLAND (M.), MASS (B.).- Absorption and excretion of sulfathiodiazole and sulfamethylthiodiazole after oral administration in human beings.
J. Lab. clin. Med. 1946, 31, 900.

- (84) NEY (J.).- Hemikrèse et protorrhée du salicylate de sodium et de l'aspirine.
Thèse Pharm. Strasbourg, 1954.
- (85) PAWLIKOWSKI (Th.).- Sur la réaction présentée par l'adrénaline dans les globules rouges du sang des mammifères.
C.R. Soc. Biol. 1935, 120, 467.
- (86) PELLERAT (J.), MURAT (M.).- Etude pharmacodynamique chez l'homme d'une solution de polyvinylpyrrolidone employée comme véhicule retard. Association avec le salicylate de sodium, les extraits cortico-surrénaux, la pénicilline.
Thérapie, 1947, 2, 49.
- (87) PETRUNKIN (A.), PETRUNKIN (M.).- Combination of gelatin with some organic bases.
J. gen. Physiol. 1928, 11, 101.
- (88) PHILIBERT (H.).- Les problèmes strychnine-quinine et strychnine-dérivés de la phénothiazine.
Bull. Soc. Pharm. Marseille, 1955, 4, 183.
- (89) QUATTRIN (N.).- Sulfamidici e derivati, Lego-Vicenza, 1953.
- (90) QUEVAUVILLER (A.).- Sur quelques propriétés pharmacodynamiques et physiochimiques des sels de quinine: influence de l'acide.
Thèse Sciences, Paris, 1943.
- (91) RALLS (J.O.).- Urea is not equally distributed between the water of blood cells and that of the plasma.
J. biol. Chem. 1943, 151, 529.
- (92) RANDALL (L.O.), ENGELBERG (R.), ILIEV (V.), ROE (M.), HAAR (H.), Mc GAVACK (T.H.).- Comparative studies on blood levels and urinary excretion of sulfisoxazole and acetyl sulfisoxazole.
Antibiotics a. Chemotherapy 1954, 4, 877.
- (93) REINHOLD (J.G.), SCHWARTZ (L.), FLIPPIN (H.F), BETHLAHMY (S.).- Permeability of red cells to sulfathiazole.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1940, 45, 317.
- (94) ROLLAND-LECLERCQ (S.).- Le dosage colorimétrique de la strychnine.
J. Pharm. Belg. 1947, 2, 283.
- (95) ROTHLIN (E.).- Das Blut und seine Funktion für den Transport und die Verteilung von Wirkstoffen.
Vierteljahrsschrift Naturforsch. Gesellsch. in Zürich, 1945, 90, 195.
- (96) SBARSKY (B.).- Die Rolle der Erythrocyten im intermediären Eiweisstoffwechsel.
Enzymologia, 1940-41, 9, 302.

- (97) SCHEIDEGGER (J.J.).- La relation entre le salicylate de soude et les protéines sériques étudiée par électrophorèse sur papier. Schweiz. Med. Wschr. 1953, 83, 406.
- (98) SCHMELKES (F.C.), WYSS (O.), MARKES (H.C.), LUDWIG (B.J.), STRANDSKOV (F.B.).- Mechanism of sulfonamide action.-I.- Acidic dissociation and antibacterial effect. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942, 50, 145.
- (99) SCHNITZER (R.J.), FOSTER (R.H.K.), ERCOLI (N.), SOO-HOO (G.), MANGIERI (C.N.), ROE (M.D.).- Pharmacological and chemotherapeutic properties of 3,4 - dimethyl-5-sulfanilamidoisoxazole. J. Pharm. exp. Therap. 1946, 88, 47.
- (100) SCHÖNHOLZER (G.).- Die Bildung von Prentosil an die Bluteiweisskörper. Klin. Wschr. 1940, 19, 790.
- (101) SEABRA (P.).- Thérapie dirigée. Recherches de Pharmacodynamique. Ann. pharm. fr. 1948, 6, 374.
- (102) SEIGNEURIN (R.).- Absorption de la pénicilline par les hématies déplasmatisées; obtention d'un sérum antibiotique par injection d'hématies pénicillinées. C.R. Soc. Biol. 1949, 143, 1215.
- (103) SIMESSEN (H.H.).- Untersuchungen über die Verteilung der Sulfanilamide im Blut. Arch. exp. Path. Pharmac. 1941, 197, 2.
- (104) SISE (H.S.).- Distribution of sulfanilamide and acetylsulfanilamide between cells and extracellular fluids. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1939, 40, 451.
- (105) SMITH (P.K.), GLEASON (H.L.), STOLL (C.G.), OGORZALEK (S.).- Studies on the pharmacology of salicylates. J. Pharm. exp. Therap. 1946, 87, 237.
- (106) SOLLIUANN (T.).- A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology. Philadelphia and London, 1945.
- (107) SPINKS (A.).- The persistence in the blood stream of some compounds related to suramin. Bioch. J. 1948, 42, 109.
- (108) STORM VAN LEEUWEN (W.), ZEIJDNER (J.).- On the influence of colloids on the action of non colloidal drugs. J. Pharmacol. 1921, 17, 121.

- (109) STRAUSS (E.), LOWELL (F.C.), TAYLOR (F.H.), FINLAND (M.).-
Observation on the absorption, excretion and distribution
of sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole and sulfamethyl-
thiazole.
Ann. intern. Med. 1941, 14, 1360.
- (110) SVEC (F.A.), RHOADS (P.S.), ROHR (J.H.).- A new sulfonamide
(Gantrisine) studies on solubility, absorption and excre-
tion.
Arch. intern. Med. 1950, 85, 83.
- (111) VAVRA (R.), KIDERY (J.).- Adsorption de la strychnine par les
globules rouges.
C.R. Soc. Biol. 1940, 133, 164.
- (112) VAVRA (R.), KIDERY (J.).- Dosage chimique de la strychnine
adsorbée par les globules rouges.
C.R. Soc. Biol. 1940, 133, 166.
- (113) WATERHOUSE (A.), SHANNON (J.A.).- On the use of sulfanilamide
in measurement of body water in the dog.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942, 50, 189.
- (114) WAY (E.L.), DAILEY (R.E.).- Adsorption, distribution and
excretion of Tripelenamine (pyribenzamine).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1950, 73, 423.

Vu

NANCY, le 12 Décembre 1955.

Le Président de thèse

F. KAYSER.

Vu et approuvé

NANCY, le 12 Décembre 1955.

Le Doyen de la Faculté,

F. KAYSER.

Vu et permis d'imprimer.

NANCY, le 12 Décembre 1955.

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

G. MAYER.

Dactylographie et Polycopie :

L. B O N N .

12, Clos Hinzelin

Rue de Nabécor

N A N C Y



